

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI



**POTANSİYEL P90 RİBOZOMAL S6 KİNAZ (RSK)
İNİHİTÖRLERİNİN KOLON KANSERİ HÜCRE MODELİNDE
ANTİKANSER ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

UFUK MÜLHİM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Esra TOKAY (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR
Prof. Dr. Berrin TUNCA

BALIKESİR, HAZİRAN - 2025

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Potansiyel P90 Ribozomal S6 Kinaz (RSK) İnhibitörlerinin Kolon Kanseri Hücre Modelinde Antikanser Etkinliklerinin Belirlenmesi**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ufuk MÜLHİM

Bu tez çalışması TÜSEB 27777 no'lu 2022-ACİL-08 / A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı kapsamında desteklenmiştir.

Ufuk MÜLHİM Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2210/A Yurtiçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

**POTANSİYEL P90 RİBOZOMAL S6 KİNAZ (RSK) İNHİBİTÖRLERİNİN
KOLON KANSERİ HÜCRE MODELİNDE ANTİKANSER ETKİNLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
UFUK MÜLHİM
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ESRA TOKAY)
(EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. FERAH CÖMERT ÖNDER)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2025**

RSK proteini hücre içerisinde çeşitli rollerde görevli olan bir proteindir. Metastaz, proliferasyon ve hücre büyümesi ve gelişmesi gibi kritik yollarda işlevi olan bu proteinin çeşitli çalışmalar sonucunda kanser hücrelerinde normale kıyasla daha fazla ifade olduğu vurgulanmıştır.

Bu tez kapsamında, *in siliko* analizler ile belirlenen ve ticari potansiyel RSK inhibitörlerinin kolorektal kanseri hücreleri ve sağlıklı model olan HUVEC hücreleri üzerine *in vitro* etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, temin edilen ticari potansiyel inhibitör adaylarının ilk olarak total RSK seviyeleri SW480 ve HT-29 hücre hatlarında western blotting metodu ile protein seviyesinde gösterilmiştir. Ticari potansiyel RSK inhibitörlerinin sitotoksik özellikleri SW480 ve HT-29 hücrelerinde MTT analizi ile belirlenmiştir ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Buna göre Y040-4759, S322-0083 ve C592-3214 kodlu bileşikler, özellikle SW480 ve HT-29 hücre hatlarında düşük IC₅₀ değerleriyle öne çıkmıştır. Annexin V/PI testi ve western Blotting testi uygulanarak apoptoz tespit edilmiştir. HT-29 hücreleri için Y040-4759, 6190-0389, V030-2239, S322-0083, C592-3214 ve V031-1748 bileşikleri etkili olurken, SW480 hücrelerinde F688-0005, Y040-4759, S322-0083 bileşikleri etkili olmuştur. Koloni formasyon ve yaralanma deneyi analizleri yapılarak hücrelerin koloni oluşturabilme ve göç potansiyelleri incelenmiştir. Bunun sonucunda HT-29 hücre hattı için F688-0005, C592-3214, V031-1748, V030-2239 ve Y040-3184 bileşiklerinin ve SW480 için ise F688-0005, C592-3214 ve S322-0083 bileşiklerinin yara iyileşme potansiyelini azaltıcı etkileri ön plana çıkmıştır. Koloni oluşturma yetilerine bakıldığında SW480 için F688-0005 ve Y040-4759 bileşiklerinin koloni oluşumunu baskıladığı, HT-29 hücreleri için ise F688-0005, C592-3214, V031-1748, V030-2239, 6190-0389 ve Y040-3184 bileşiklerinin koloni oluşturma kabiliyetini azaltmıştır. Protein seviyesinde ki sonuçlarına göre ise SW480 hücre hattında Y040-4759 ve HT-29 hücre hattında F688-0005 ve C592-3214 bileşiklerinin, total ve fosforile RSK düzeylerini düşürdüğü görülmüştür. Sonuç olarak, özellikle F688-0005 ve C592-3214'ün RSK inhibisyonu yoluyla kolon kanseri hücrelerinde potansiyel antikanser bileşikler olma yolunda umut vaat etmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: Apoptoz, kolon kanseri, RSK, RSK inhibitörleri

Bilim Kod / Kodları : 20603, 20606, 20610

Sayfa Sayısı : 96

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE ANTICANCER ACTIVITIES OF POTENTIAL P90 RIBOSOMAL S6 KINASE (RSK) INHIBITORS IN A COLON CANCER CELL MODEL

MSC THESIS

UFUK MULHİM

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. ESRA TOKAY)

(CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. FERAH CÖMERT ÖNDER)

BALIKESİR, JUNE - 2025

RSK is a multifunctional protein that plays critical roles in various cellular pathways, including metastasis, proliferation, and cell growth and development. Numerous studies have highlighted that RSK is expressed at higher levels in cancer cells compared to normal cells.

In this thesis, the aim was to investigate the *in vitro* effects of commercially available potential RSK inhibitors, identified via *in silico* analyses, on colorectal cancer cell lines and a healthy control cell line (HUVEC). Initially, the total RSK expression levels in SW480 and HT-29 cell lines were demonstrated at the protein level using the western blotting technique. The cytotoxic properties of the selected commercial RSK inhibitor candidates were determined through MTT assays on SW480 and HT-29 cells, and their IC₅₀ values were calculated. Based on these results, compounds Y040-4759, S322-0083, and C592-3214 were particularly notable for their low IC₅₀ values in both cell lines.

Apoptosis was evaluated using both Annexin V/PI assay and western blotting. For HT-29 cells, compounds Y040-4759, 6190-0389, V030-2239, S322-0083, C592-3214, and V031-1748 were effective in inducing apoptosis, while F688-0005, Y040-4759, and S322-0083 were effective in SW480 cells. Colony formation and wound healing (scratch) assays were performed to assess the colony-forming ability and migratory potential of the cells. Accordingly, F688-0005, C592-3214, V031-1748, V030-2239, and Y040-3184 inhibited wound healing in HT-29 cells, while F688-0005, C592-3214, and S322-0083 showed similar effects in SW480 cells. Regarding colony formation, F688-0005 and Y040-4759 significantly reduced colony formation in SW480 cells, whereas F688-0005, C592-3214, V031-1748, V030-2239, 6190-0389, and Y040-3184 suppressed colony formation in HT-29 cells.

At the protein level, compound Y040-4759 was found to reduce total and phosphorylated RSK levels in SW480 cells, while F688-0005 and C592-3214 decreased these levels in HT-29 cells. In conclusion, especially F688-0005 and C592-3214 show promising potential as anticancer agents targeting RSK inhibition in colorectal cancer cells.

KEYWORDS: Apoptosis, colorectal cancer, RSK, RSK inhibitors,

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Kolorektal Kanser	1
1.2 Kolorektal Kanser Tipleri	3
1.2.1 Kromozom kararsızlığı (Chromosome Instability; CIN) sebepleri	3
1.2.2 MSI (Mikrosatellitlerin dengesizliği) sebepleri	4
1.3 Kolorektal Kanseri Tedavi Yöntemleri	5
1.3.1 Ameliyat/Operasyon	5
1.3.2 Kriyoterapi	5
1.3.3 Radyoterapi	5
1.3.4 Kemoterapi	6
1.3.5 Monoklonal antikorlar	6
1.4 RSK (Serin/Treonin Kinaz) Proteini	7
1.4.1 RSK geninin izoformları	8
1.4.2 RSK geninin izoformlarının düzenlenmesi	9
1.4.3 RSK genlerinin aktivasyonu	10
1.5 RSK proteinlerinin görevleri	11
1.5.1 Protein sentezi	11
1.5.2 Hücre döngüsü ve proliferasyon	11
1.5.3 Hücre hayatta kalması	12
1.5.4 Hücre hayatta kalması	12
1.6 RSK proteinleri ve kanser	13
1.7 RSK inhibitörleri	13
1.7.1 SL0101	14
1.7.2 BI-D1870	14
1.7.3 LJH685 ve LJI308	14
1.7.4 BIX02565	15
1.7.5 BRD7389	15
1.7.6 FMK	15
1.7.7 PMD-026	15
1.8 RSK ekspresyon düzeyleri ve kolon kanseri prognozundaki önemi	16
2. TEZİN AMACI	18
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	20
3.1 Materyaller	20
3.1.1 İnhibitör adaylarının belirlenmesi ve temini	20
3.1.2 Laboratuvar cihazları	23
3.1.3 Kullanılan kimyasallar	24
3.1.4 Kullanılan hücre soyları	25
3.2 Yöntemler	27

3.2.1	Laboratuvar temizlenmesi ve malzeme sterilizasyon aşaması	27
3.2.2	Hücre kültürü teknikleri.....	27
3.2.2.1	Hücre besiyerlerinin hazırlanması	27
3.2.2.2	Hücrelerin pasajlanması	28
3.2.2.3	Hücrelerin dondurulması	28
3.2.2.4	Hücrelerin sayılması	28
3.2.3	Sitotoksosite testi.....	28
3.2.4	Koloni formasyon deneyi	30
3.2.5	Yaralanma (çizik) deneyi.....	30
3.2.6	Hücrelerden protein eldesi.....	30
3.2.6.1	Protein miktar tayini	31
3.2.6.2	SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	32
3.2.6.3	Protein hazırlama	32
3.2.6.4	Western Blot deneyi	33
3.2.6.5	Antikorlama	34
3.2.6.6	Problama	35
3.2.7	Flow Sitometre	35
3.3	İstatistiksel analiz	35
4.	BULGULAR.....	36
4.1	RSK1 ve RSK2 Proteinlerinin Hücre İçi Seviyelerinin Belirlenmesi	36
4.2	Seçilen İnhibitör Adaylarının Hücresel Analizlerinin MTT Sitotoksitesi	36
4.2.1	Potansiyel inhibitörlerin HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi	37
4.2.2	Potansiyel inhibitörlerin SW480 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi	45
4.2.3	Potansiyel inhibitörlerin sağlıklı model HUVEC üzerindeki sitotoksik aktivitesi.	51
4.2.4	Potansiyel inhibitörlerin IC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılması.....	57
4.3	Toksik Olduğu Belirlenen Potansiyel İnhibitörlerin Gösterdiği Proliferatif ve Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi.....	58
4.4	Potansiyel İnhibitörlerin Oluşturduğu Apoptotik Etkinin Flow Sitometre İle Gösterilmesi	60
4.5	Bileşiklerin Hücre Göçü ve Koloni Oluşturma Yetilerinin Belirlenmesi.....	64
4.6	Seçilmiş Olan İnhibitörlerin Yara İyileştirme Etkilerinin Belirlenmesi.....	66
4.6.1	HT-29 hücrelerinde potansiyel inhibitörlerin yara iyileştirme etkisinin belirlenmesi.....	66
4.6.2	SW480 hücrelerinde potansiyel inhibitörlerin yara iyileştirme etkisinin belirlenmesi.....	71
4.7	Seçilmiş Olan İnhibitörlerin RSK Yolağı Üzerindeki Aktvitelerinin Belirlenmesi .	74
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA	80
6.	KAYNAKLAR	84
EKLER	94	
EK A:	Tez Çalışmasında Kullanılan Büyüklük Belirteci	95
ÖZGEÇMİŞ	96	

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: RSK geni izoformları.....	8
Şekil 1.2: RSK geni izoformlarının yapısı	9
Şekil 1.3: RAS/MAPK yolağının RSK proteinini aktive şeması.....	11
Şekil 1.4: RSK1-NTKD ve CTKD'yi hedef alan bazı bilinen inhibitörlerin kimyasal yapıları	13
Şekil 2.1: Tez iş akış şeması	19
Şekil 3.1: SW480 hücre hattı	26
Şekil 3.2: HT-29 hücre hattı.....	26
Şekil 3.3: HUVEC hücre hattı.....	26
Şekil 3.4: MTT bileşiğinin formazan tuzuna dönüşümü.....	29
Şekil 3.5: Bradford eğrisi grafiği ve denklemi.....	32
Şekil 4.1: Hücrelerde bulunan RSK geninin Western Blot görüntüsü.....	36
Şekil 4.2: Y040-4759 İnhibitör adayı HT-29 MTT grafiği.....	37
Şekil 4.3: Y040-4759 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği	38
Şekil 4.4: V031-1748 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği	38
Şekil 4.5: V030-2239 inhibitör Adayı HT-29 MTT grafiği.....	39
Şekil 4.6: S322-0083 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği.....	40
Şekil 4.7: F688-0005 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği.....	41
Şekil 4.8: D217-0222 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği	42
Şekil 4.9: C592-3214 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği	43
Şekil 4.10: 6190-0389 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği.....	44
Şekil 4.11: Y206-0033 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği.....	45
Şekil 4.12: STOCK1N-83113 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği.....	45
Şekil 4.13: Y040-4759 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği.....	46
Şekil 4.14: Y040-3184 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği.....	46
Şekil 4.15: V031-1748 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği.....	47
Şekil 4.16: V030-2239 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği.....	47
Şekil 4.17: S322-0083 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği	48
Şekil 4.18: F688-0005 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği	49
Şekil 4.19: D217-0222 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği.....	49
Şekil 4.20: C592-3214 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği.....	50
Şekil 4.21: 6190-0389 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği	50
Şekil 4.22: Y206-0033 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği.....	51
Şekil 4.23: STOCK1N-83113 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği	51
Şekil 4.24: V030-2239 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	52
Şekil 4.25: C592-3214 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği	52
Şekil 4.26: Y040-4759 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	53
Şekil 4.27: S322-0083 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	53
Şekil 4.28: F688-0005 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	54
Şekil 4.29: D217-0222 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	54
Şekil 4.30: 6190-0389 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	55
Şekil 4.31: Y206-0033 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	55
Şekil 4.32: Y040-3184 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	56
Şekil 4.33: V031-1748 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	56

ŞEKİL LİSTESİ (devam)

Şekil 4.34: STOCK1N-83113 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği.....	57
Şekil 4.35: a) HT-29 hücreleri BAX ve beta actin antikör görüntüsü b) BAX grafiği.....	59
Şekil 4.36: a) SW480 hücreleri BAX, BCL-2 ve β -aktin antikörleri görüntüsü b) BAX grafiği c) BCL-2 grafiği.....	60
Şekil 4.37: HT-29 hücreleri flow sitometre görüntüsü	61
Şekil 4.38: HT-29 hücreleri flow sitometre grafiği.....	62
Şekil 4.39: SW480 hücreleri flow sitometre görüntüsü	62
Şekil 4.40: SW480 hücreleri flow sitometre grafiği	63
Şekil 4.41: HT-29 PI ile hücre siklusu evrelerinin karşılaştırmalı grafiği	63
Şekil 4.42: SW480 PI ile hücre siklusu evrelerinin karşılaştırmalı grafiği.....	64
Şekil 4.43: HT-29 hücreleri koloni formasyon görüntüleri	64
Şekil 4.44: HT-29 hücreleri koloni formasyon grafiği.....	65
Şekil 4.45: SW480 hücreleri koloni formasyon görüntüleri	65
Şekil 4.46: SW480 hücreleri koloni formasyon grafiği	66
Şekil 4.47: HT-29 hücreleri çizik deneyi görüntüleri	66
Şekil 4.48: F688-0005 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği	67
Şekil 4.49: C592-3214 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği.....	68
Şekil 4.50: V031-1748 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği.....	68
Şekil 4.51: 6190-0389 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği	69
Şekil 4.52: V030-2239 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği.....	69
Şekil 4.53: Y040-3184 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği.....	70
Şekil 4.54: SL0101 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği	70
Şekil 4.55: SW480 hücre hattı çizik deneyi görüntüleri	71
Şekil 4.56: F688-0005 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği.....	72
Şekil 4.57: Y040-4759 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği	72
Şekil 4.58: C592-3284 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği.....	73
Şekil 4.59: S322-0083 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği.....	73
Şekil 4.60: SL0101 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği.....	74
Şekil.4.61: HT-29 Hücre hattı RSK-pRSK görüntüsü.....	75
Şekil 4.62: HT-29 Hücre hattı RSK-pRSK grafiği	75
Şekil 4.63: pRSK ve RSK Western Blot görüntüleri soldan sağa marker, HT-29 F688-0005, HT-29 SL01-01, HT-29 Kontrol, SW480 Bileşikler, SW480 SL01-01, SW480 Kontrol.....	76
Şekil 4.64: HT-29 F688-0005 pRSK kat protein grafiği	76
Şekil 4.65: HT-29 F688-0005 RSK kat protein grafiği	77
Şekil 4.66: HT-29 F688-0005 pRSK/RSK kat protein grafiği.....	77
Şekil 4.67: SW480 Bileşikler RSK kat protein grafiği	78
Şekil 4.68: SW480 pRSK kat protein grafiği.....	78
Şekil 4.69: SW480 pRSK/RSK kat protein grafiği.....	79

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: <i>İn-vitro</i> çalışılan bileşiklerin açık yapıları ve özellikleri	21
Tablo 3.2: Cihaz listesi	24
Tablo 3.3: Kullanılan malzeme listesi	24
Tablo 3.4: MTT deneyi çözeltisi hazırlanışı.....	29
Tablo 3.5: RIPA hazırlanışı	31
Tablo 3.6: Bradford hazırlanışı	31
Tablo 3.7: 2 adet ayırma jeli hazırlanışı	33
Tablo 3.8: 2 adet yığıma jeli hazırlanışı	33
Tablo 3.9: Western blot deneyi çözeltileri.....	34
Tablo 4.1: HT-29 Hücreleri IC ₅₀ değerleri	57
Tablo 4.2: SW480 Hücreleri IC ₅₀ değerleri.....	58
Tablo 4.3: HUVEC Hücreleri IC ₅₀ değerleri	58
Tablo 5.1: Sonuç tablosu	83

SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ

APS	: Amonyum Persülfat
β	: Beta
BSA	: Bovine Serum Albumin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ECL	: Enhanced Chemiluminescence
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EGTA	: Etilenglikoltetraasetikasit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dH₂O	: Distile Su
FCS	: Fetal Calf Serum
mM	: Milimolar
MTT	: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]
mg	: Miligram
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVDF	: Povinilidin Diflorid
pRSK	: Fosforillenmiş Ribozomal S6 Kinaz
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
RNaz	: Ribonükleaz
RSK	: Ribozomal S6 Kinaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: Tetrametiletildiamin
PBS	: Phosphate Buffered Saline
TE	: Tripsin EDTA
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

ÖNSÖZ

Tezim süresince her zaman her şartta yanımda bulunan ve yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a, hem danışmanım hem de yol göstericim olan Doç. Dr. Esra TOKAY'a, tezimin tamamındaki emeğiyle ve yardımlarıyla yanımda olan eş danışmanım Doç. Dr. Ferah CÖMERT ÖNDER'e, *in siliko* analizleriyle tezime katkı sağlayan Sevil KALIN'a, yine rehberlikleriyle, yardımlarıyla benim tezimde çok fazla emeği olan Dr. Öğr. Üyesi Nelin HACIOĞLU ve Arş. Gör. Dr. Serhad ONAT'a çok teşekkür ediyorum.

Tez deney aşamasında ve tez yazma sürecinde her zaman yanımda olan, benim için dosttan daha da ileride bulunan Hasan ÇAPRAZ'a, çalışma ortamını daha eğlenceli kılan ve deney aşamasındaki problemleri çözmemde yardımcı olan değerli çalışma arkadaşlarım Şevin AVŞAR'a Yasemin KELEŞ'e, Feyza Nur SAV'a, Aylin TÜRKOĞLU'ya, Canberk TOPRAK'a, Merve DEMİR'e, Aslınur MÜZELLEFOĞLU'ya, Büşra UZUN'a, İlayda SEZER'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Her şeyden önce benim bu günlerde olmamı sağlayan annem, desteğini hiç esirgemeyen Bahriye MÜLHİM'e, zor durumda kaldığım zaman tavsiyeleriyle bana yol gösteren babam Levent MÜLHİM'e, başka şehirlerde olsak da her zaman yanımda hissettiğim, hayatım boyunca yanımda olacağını bildiğim kardeşim Ekrem Tan MÜLHİM'e, bana her zaman rehberlik eden ve yanımda olan teyzem Hayriye FİDAN'a ve hayatımın her anında olduğu gibi, bu zorlu süreçte de yanımda olan, sabrı, sevgisi ve desteğiyle bana güç veren, her umutsuzluğa kapıldığımda kalkmama yardım eden sevgili nişanlım İpek Ece KÖÇKAR'a sonsuz teşekkürlerimle.

Balıkesir, 2025

Ufuk Mülhim

1. GİRİŞ

1.1 Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser 2020 verilerine göre dünyada en fazla görülen kanser türlerinde 3. sıradadır [1]. Hasta sayısı her geçen gün daha da artmaktadır ve verilere göre 2035 yılında 2.5 milyon kolorektal kanser hastasının olacağı düşünülmektedir [2]. Kolorektal kanser tek bir patolojik kimliğe sahip olmadığından moleküler olarak çok fazla yolakla ilişkilendirilendirilir. Bundan dolayı antitümör ajanlarına karşı direnç geliştirme olasılığı yüksektir [3]. Sağlıklı kolon ve rektal epitel hücresinde oluşan mutasyonların birikmesiyle polip oluşur, sonrasında oluşan bu polip karsinomaya dönüşür [4]. Çok farklı risk faktörlerine sahiptir.

Kolorektal kansere neden olan risk faktörlerini ikiye ayırabiliriz. Birincisi modifiye edilebilir olanlardır. Alkol alımı, sigara kullanımı, kilo, fiziksel aktivite, sağlıklı beslenmeme ve stres gibi risk faktörleri bu gruba dahil edilebilir. İkincisi ise modifiye edilemeyen risk faktörleridir. Bu faktörler yaş, cinsiyet, aile geçmişi, bağırsak mikrobiyotası ve genetik yatkınlık sayılabilir [5]. Alkol kullanımının da insanlarda kolorektal kanser riskinin arttığını göstermiştir [6, 7]. Yine aynı şekilde sigara kullanımının da kolorektal kansere etkisi görülmüştür [8].

Sigara ile birlikte inhalasyon yoluyla vücuda giren nitrosamin, heterosiklik amin, polisiklik aromatik hidrokarbon ve benzen gibi toksik kimyasallar kolorektal mukus hücrelerinde karsinojen etkiye sahiptirler. Bu gibi maddelere karşı olan uzun süreli maruziyet kolorektal kanseri hücrelerinde moleküler değişikliklere neden olarak kolorektal kansere sebebiyet verebilmektedirler [9]. Obezite de kolorektal kanserini indükleyebilmektedir. IL-6 ve tumor necrosis factor alfa gibi pro-inflammatuvar sitokinler mekanizmasıyla ve obezitede yükselensafra kesesi salgısından dolayı oluşan enflamasyonlar kolorektal kanseri tetikleyebilir [10, 11].

Hareketsiz yaşam da dolaylı olarak kolorektal kanserle ilişkilendirilebilmektedir. Hareketsiz yaşamın obeziteye, insülin direncine ve yüksek kan şekeri seviyesine sebebiyet vermesi, anormal bağırsak peristaltizmine sebep olabilmektedir. Bununla birlikte hareketsiz yaşamın kendisi de buna sebebiyet verebilmektedir [5].

Dengesiz ve sağlıksız beslenme de kolorektal kanserde etkili olabilmektedir. İşlenmiş kırmızı etin çokça tüketiminden dolayı rapor edilmiş kolorektal kanser vakaları bulunmaktadır. Etin çok yüksek derecelerde pişmesi heterosiklik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların açığa çıkmasını sağlar. Bu karsinojenlerle kolorektal mukusun teması kolorektal kanser riskini artırabilir [12, 13]. Ayrıca yüksek yağ tüketimi de kolorektal kanser riskini artırabilmektedir. Fakat bunula ilgili bir bulgu bulunmamaktadır [14].

Fizyolojik stres ise hipotalamik salgı bezlerini fazlaca aktive ettiğinden bu durum anormal metabolik aktivitelere, immün sisteminde bozukluklara ve kansere yol açabilmektedir [15]. Bazı hayvan deneyleri sonuçlarına göre stresten kaynaklanan kortizol, epinefrin, ve norepinefrin salgısının artması da kansere yol açan faktörler arasında yer almaktadır [16]. Kronik fizyolojik stres ise mutasyon, tümör büyümesi, hücre ölümüne karşı direnç, proliferasyon sinyalleri ve metastaz gibi farklı tümör oluşumu fazlarına etki edebilmektedir [17].

Kontrol edilemeyen risk faktörleri arasında ise yaş faktöründen bahsedilebilir. İlerleyen yaş kolorektal kanser riskini artırmaktadır. Son yapılan çalışmalara göre kadınların kolorektal kanseri riskinin erkeklerden daha az olduğu keşfedilmiştir. Erkeklerdeki kolorektal kansere yakalanma riski oranı 100.000'de 23.4 iken bu oran kadınlarda 100.000'de 16.2 olarak ölçülmüştür [18].

Genetik yatkınlıkta ile oluşan ve kolorektal kanserler içinde yaygın olarak bulunan kanserler de vardır. Bunlar içinde, adenomatozis polipozis koli (APC) geninde ortaya çıkan germ hattı (yumurta ve sperm hücrelerinde bulunan ve nesilden nesile aktarılabilen) mutasyonlardan oluşan kolorektal kanser ve DNA hasar onarımında görev alan genlerin değişmesi sonucu ortaya çıkan kanser olarak adlandırılan Lynch sendromu sayılabilir [19]. Bu hasta populasyonunda, kolorektal kanseri olan hastaların birinci derece akrabalarında da polip oluşumuna yatkınlık gözlenmektedir [20].

En büyük kolorektal kanseri risk faktörlerinden bir tanesi ise bağırsak florası olarak gösterilebilir. [21]. Mikrobiyotanın düzeltilmesi kolorektal kanserden korunma yöntemi olarak düşünülebilir [22].

1.2 Kolorektal Kanseri Tipleri

Kolorektal kanser çeşitli mutasyonların birikmesiyle oluşan bir kanser tipidir. Bu mutasyonlar birleşir ve normal bağırsak epitel hücrelerini benign neoplazmalara dönüştürür. Daha sonrasında bu neoplazmalar ise karsinomaya dönüşürler Genomik instabilite kaybolunca kolorektal kanser riski artar. Genomik instabilite birden fazla şekilde etkilenebilir. Genomik analizler, somatik hücrelerde oluşan ortalama genin mutasyonunun kolorektal kansere sebebiyet verdiğini göstermiştir. Ayrıca bu sayı 100 gene kadar çıkabilmektedir, ki bu da hastalığın heterojenliğine dikkat çekmektedir [23]. Kolorektal kanser sadece tek bir çeşitten oluşan bir hastalık değildir. Bazı moleküler veya morfolojik alt türlere ayrılır. Büyük çoğunluğunu genetik düzensizlikler oluşturur ve en az 2 farklı mekanizması vardır.

Birinci mekanizma en yaygın olanıdır. %84'ünü oluşturmakla birlikte kromozomal dengesizlikten kaynaklanır. Kromozomal instabilite (CIN) kromozomlardaki büyük değişiklikleri içine alan gruptur. Bu değişiklikler delesyonlar, translokasyonlar veya diye diğer kromozomal değişiklikler olabilir [24]. Önceki çalışmalar CIN tipi kolorektal kanserleri APC tümör baskılayıcı gen üzerinde oluşan çeşitli baskılayıcı veya inaktive edici mutasyonlarla ilişkilendirmiştir.

İkinci grup ise yaklaşık %15'ini oluşturur ve DNA tamir mekanizması olan mismatch repair (MMR) da gerçekleşen bozulmalardan dolayı mikrosatelitlerin dengesizliğinden (MSI) oluşan mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu grup genel olarak TP53 geninde bir diploid görüntü ortaya çıkarır [25].

1.2.1 Kromozom kararsızlığı (Chromosome Instability; CIN) sebepleri

CIN (Chromozom Instability) tümörleri genelde Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog (KRAS) veya Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Alfa (PIK3CA) gibi onkogen aktivasyonu ile ve APC, SMAD4 gibi tümör baskılayıcı genlerin birlikte mutasyona uğramasıyla oluşur. Bu durum ilk defa 1990 yılında Fearon ve Vogelstein tarafından açıklanmıştır [26].

Bu durumun en önemli sebebi Wingless ve Int-1 (WNT) yolağının aşırı indüklenmesidir. WNT yolağının aşırı indüklenmesi de genel olarak APC geninde oluşan mutasyondan kaynaklanmaktadır. Adenomaların %80'lik kısmı APC geninde oluşan mutasyondan, %5 ila

%10'luk kısmı ise WNT yolağındaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [27]. APC geni WNT yolağını baskılayan önemli bir negatif düzenleyici rolünü oynamaktadır. Aksin-APC kompleksinin bir parçası olarak rol oynar ve WNT bileşeni olan β -kateninin parçalanmasını sağlar. Eğer APC geninde bir bozulma olursa bu durum ortamda fazla beta katenin birikmesine ve bunun sonucunda WNT yolağının aşırı bir şekilde aktive edilmesine neden olacaktır. Ayrıca beta katenin seviyesinin aşırı yükselmesi sitoplazmadaki fazla beta kateninin hücre çekirdeğine geçmesine ve oradaki MYC gibi başka genlerin aktivasyonuna sebebiyet verecektir [28].

WNT yolağında meydana gelen bu düzensiz karmaşa proliferasyon ve farklılaşma sürecinde düzensizliğe neden olur. Bu düzensizlik ise displastik kript denen düzensiz bağırsak yapılarını oluşturur. Bu bezler hücresel yapısı anormal olan bağırsak bezleridir ve kanser başlangıcı olarak gösterilebilir. Bu bezler zamanla diğer tümör baskılayıcı genlerin de kaybolmasıyla adenomlara dönüşebilir. Adenomdan invaziv karsinoma evresine geçiş ise genelde tümör baskılayıcı TP53 geninde oluşan mutasyondan veya bu genin kaybolmasından dolayı sağlanabilir [28].

1.2.2 MSI (Mikrosatellitlerin dengesizliği) sebepleri

DNA'nın eşlenmesinde hatanın giderilememesi ve mikrosatellitlerdeki dengesizlikler hiper mutasyonlu kansere ve Lynch sendromuna neden olmaktadır. Lynch sendromu, önceki adıyla aileden gelen polip olmayan kolon kanseri sendromu (HNPCC), kalın bağırsağı ve ikinci olarak endometriyumu etkileyen kalıtsallıkla ilişkilendirilen kanser tipidir. Bununla birlikte yumurtalık, mide, ince bağırsak, üreter gibi diğer organlarda da adenokarsinom oluşma riski artmaktadır. Neoplastik hücrelerde meydana gelen DNA MMR sistemi bozuklukları, bu hücrelerde neoplazm oluşmasına sebep olmaktadır. Bu sendrom hatalı MMR DNA uyumsuzluk tamir genleri, çoğunlukla MutS Homolog 2 (MSH2) veya MutL Homolog 1 (MLH1), genlerindeki mutasyonların kalıtımla aktarılmasıyla ortaya çıkmaktadır. Tümör oluşumunda genelde ikinci MMR aleli susturmuş, mutasyona uğramış, delesyonla silinmiş veya metillenmiştir. Bu şekilde MMR genlerinin ikisi de etkisini kaybetmiş olur. Lynch sendromunda en çok etkilenen genler MSH2 ve MLH1 genleridir. Bu sendromun yaklaşık %45'i bu genlerdeki bozukluklardan dolayı ortaya çıkar. Geri kalan kısım genelde MutS Homolog 6 (MSH6) ve Postmayotik Segregasyon Artmış 2 (PMS2) genindeki bozukluklardan dolayı ortaya çıkmaktadır [29, 30].

1.3 Kolorektal Kanseri Tedavi Yöntemleri

Kolorektal kanserin birden fazla tedavi yöntemi bulunmaktadır. Bunları ameliyat, krayoameliyat, kemoterapi, radyoterapi ve hedefli tedavi olarak sıralayabiliriz [31].

1.3.1 Ameliyat/Operasyon

En yaygın tedavi yöntemlerinin başında ameliyat ile tümörü alma gelir. Özellikle tümör metastazla karaciğere sıçrarsa bu yöntem ilk kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu ameliyat laparoskopik yada açık ameliyat şeklinde uygulanabilir [32]. Fakat bu yöntemin uygulanabilmesi için var olan tümörün karakteristik özellikleri bilinmelidir. Uygulamadan önce histolojik analizler yapılmalıdır. Tümörün kolonoskopi yöntemiyle incelenmesi gerekebilir [33].

1.3.2 Kriyoterapi

Kriyoterapi yöntemi rektal kanserde uzun yıllardan beri kullanılan bir tedavi yöntemidir. Düşük ısılar kullanılarak tümörün ablasyona uğratılması prensibine dayanır. Tümörü aşırı soğuk ile muamele ederek kanser hücrelerini öldürmeyi amaçlamaktadır. Prostat, karaciğer, böbrek gibi başka tümörlerin tedavilerinde de kullanılabilir [34]. Düşük anestezi kullanımı, kolay operasyon şekli anüse minimum zararı olması gibi birçok avantajı olmasına rağmen kriyoablasyon ile kolorektal kanser tedavisi çok yeni bir tedavi seçeneğidir ve konu üzerinde araştırmalar devam etmektedir [35].

1.3.3 Radyoterapi

Tümörlerde bulunan stroma tümörün büyümesinde ve gelişmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bağışıklık baskılayıcı sitokin salgılama, metabolik düzenlemeleri tümör lehine değiştirme gibi görevlere sahiptir. Ayrıca proliferasyonun istendiği gibi devam etmesi için T hücrelerinin tümör hücrelerine doğrudan temasını da engellemeye çalışmaktadır [36]. Fakat yeni çalışmalar göstermektedir ki, lokalize tedavi yöntemleri, özellikle radyoterapi yöntemi, tümörlerde bulunan stroma dokusuna zarar vermektedir. Ayrıca radyoterapi, tümörü immünojenik ölüme yönelmesi için uyarmaktadır. Bu durum tümör antijenlerinin sekresyonuna sebep olup immün sistemin daha da etkili çalışmasına olanak sağlamaktadır. Bu durum radyoterapinin tümör mikroçevresindeki tedavi edici etkilerini artırmaktadır [37]. Radyoterapi kolorektal kanser hastalarında normal şartlarda önerilmese de bazı durumlarda avantajlı olabilmektedir. Tümörün ulaşılamadığı veya tamamen alınamadığı hastalar bu durumlara örnektir. Ayrıca tekrarlama durumlarında da

radyoterapi bir tedavi opsiyonu olarak düşünölebilmektedir. Fakat bu da her durumda kullanılmamakta ve vakaya göre değerlendirilmesi gerekmektedir [38].

1.3.4 Kemoterapi

Kemoterapi yöntemi birçok ilacın kullanımı veya kombinasyonu ile tümörün büyümesini durdurmada kullanılan bir tedavi yöntemidir. Fakat bu tedavi yönteminin çok fazla yan etkisi bulunmaktadır. Bu yan etkilere anemi, diyare, gastrointestinal toksisite, mukozit, baş dönmesi, kusma, bulantı gibi durumlar örnek olarak gösterilebilir [39]. Bu yan etkilerin yanı sıra ilaçlara karşı direnç gelişiminin de oluşur. Bundan dolayı bu tedavi yönteminden alınan sonuçlar tatmin edici olmayabilir [40]. Kemoterapötik ilaçlar basitçe hücreleri öldürerek ve bölünme döngülerini bozarak tedavi etmeye çalışırlar. Ayrı ayrı veya kombine olarak verilebilen bu ilaçlar aynı zamanda lokal etki göstermesi amacıyla kanserli bölgeye enjekte edilerek de uygulanabilmektedir [41]. Kemoterapötik ajanların çalışma prensipleri de birbirinden farklıdır. Bazıları hücre bölünmesini ve üremeyi durdururken bazıları kanser hücrelerinin büyümesi için ihtiyaç duyduğu molekülleri inhibe ederler. Bazı ilaç tipleri apoptozu indüklerken bazıları tümör çevresinde damarlanma oluşumunu durdurmaktadır. Ayrıca antimetabolitler ise hücrelerin eşlenmesinde kullanılan nükleotidleri taklit ederek hücre S fazında iken çok yüksek öldürücü etkiye sahiptirler [42].

Yaygın kemoterapötiklere 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliptatin ve leucovorin örnek olarak gösterilebilir. Uzun zaman boyunca en yaygın kullanılanı ve ilk tedavi seçeneği olarak kullanılanı 5-fluorouracildir ve kolorektal kanserde çok etkili olduğu düşünölmüştür. Fakat bu ilacın, kısa yarılanma ömrü, düşük miktarda emilim, non-selektif tedavi gibi çok fazla negatif yönü bulunmaktadır [43].

1.3.5 Monoklonal antikorlar

Moleküler alandaki gelişmeler ve kanser alanındaki bilgiler monoklonal antikorların doğuşunda çok önemli rol oynamıştır [44]. İlacın hücrenin dış tarafında bulunda bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak çeşitli yolakları inhibe etme prensibi ile çalışan bu ilaçlar kolorektal kanserde de popülerite kazanmıştır [45].

FDA tarafından onaylanan iki çeşit monoklonal antikor bulunmaktadır. Bunlardan ilki VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) inhibitörüdür. Bevacizumab VEGF reseptörlerine bağlanan bir monoklonal antikordur. Bu reseptörlere bağlanarak kanser hücrelerinin

gerçekleştirdiği anjiyogenez, proliferasyon, hücre göçü gibi durumları inhibe eder [46]. Diğer grup ise EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptörü) inhibitörüdür ve cetuximab ile panitumumab bu prensiple çalışmaktadır. Cetuximab kimerik immunoglobulin antikordur, panitumumab ise insan immünoglobulin antikordur. Bu iki antikor EGF reseptörlerine yarışmalı olarak bağlanır ve EGF in bağlanmasını önler. Bu şekilde anjiyogenezin ve proliferasyonun durdurulmasını sağlar EGFR inhibitörü olmasının yanı sıra Cetuximab'ın, pro-anjiyogenik faktörleri indükleyen VEGF'i inhibe ettiği de bilinmektedir. Bu ilaçlar tek başına, birbiriyle kombine, ya da kemoterapi ile kombine olarak da kullanılabilirler [47].

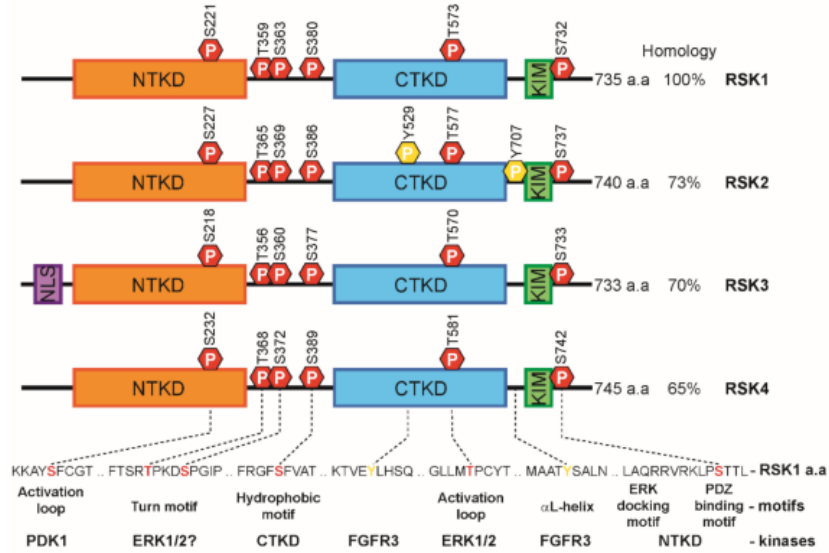
1.4 RSK (Serin/Treonin Kinaz) Proteini

Serin/treonin protein kinaz ailesi p90 ribozomal S6 kinaz (RSK) dört protein (RSK1-4) içerir (Şekil 1.1) [48]. RSK'lar aynı polipeptit zincirinde iki farklı kinaz alanı içerir. Bu kinaz alanlarından N-uç Kinaz Alanı (NTKD) AGC kinaz grubuna aitken, C-uç Kinaz Alanı (CTKD) CAMKII grubuna ait olduğundan gen duplikasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Bu katalitik alanlar dört izoformda yüksek bir dizi benzerliğine sahipken, N- ve C-uçlarındaki sekanslarından dolayı N- ve C-uçlar korunmamıştır [48]. C-uç bölgesi otofosforilasyondan, N terminal bölgesi ise substrat fosforilasyonundan sorumludur [49]. C-uç bölgesi kendi içinde iki motif içerir. Bunlar; ERK in bağlanma bölgesi olan KIM ve PDZ domaini içeren proteinler için Tip 1 PDZ bağlanma domeni. [50].

Bu 4 izoformun dışında Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 (MSK1) ve Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 2 (MSK2) adı verilen RSK benzeri protein kinazlar da hücrede bulunmaktadır [48, 51]. Genel olarak iki terminalden ve bir adet bağlayıcı parçadan oluşurlar. Bu kinazlar, Extracellular signal-Regulated Kinaz (ERK) yoluyla fosforillenerek aktive edilirler. Aynı zamanda C- ucunun oto fosforillenmesi de aktivasyona sebep olabilir. MSK1 ve MSK2 de bu yolla aktive olurlar [48]. Aktive olan C- ve N- uçlarını fosforilleyerek proteinin aktivasyonunu sağlar. Aktive olan N- ucu kullanarak hedeflerine ulaşır ve fosforilasyon işlemini gerçekleştirir. Bunun sonucunda proliferasyon, hücre büyümesi, transkripsiyon gibi hayati olaylar indüklenir [51]. Bu yolun uygun olmayan şekilde regüle edilmesi kanser gibi hastalıklara yol açabilir [52].

1.4.1 RSK geninin izoformları

İnsanda RSK proteininin dört izoformu ifade edilmektedir (Şekil 1.1). Küçük farklılıklar dışında bu dört izoform %75 oranında birbirine benzerlik göstermektedir. N- ve C-uç olmak üzere iki ana uç kısmı bulunmaktadır ve bununla beraber C-ucuna yakın olarak KIM kinaz interaksiyon motif adı verilen kinaz bağlanma motifi yer almaktadır [52, 53].



Şekil 1.1: RSK geni izoformları [54]

RSK proteinleri inaktif halde oldukları zaman sitoplazmada yer alırlar. ERK1/2 yolaklarının etkisiyle aktive olduklarında hücre çekirdeğine geçiş yaparlar ve immediate early gen ekspresyonu başlar. RSK4 diğer izoformlardan farklı olarak yapısal olarak aktiftir ve sitozolde bulunur. Bundan dolayı büyüme faktöründen bağımsız bir şekilde kinaz aktivitesi sergileyebilir [55].

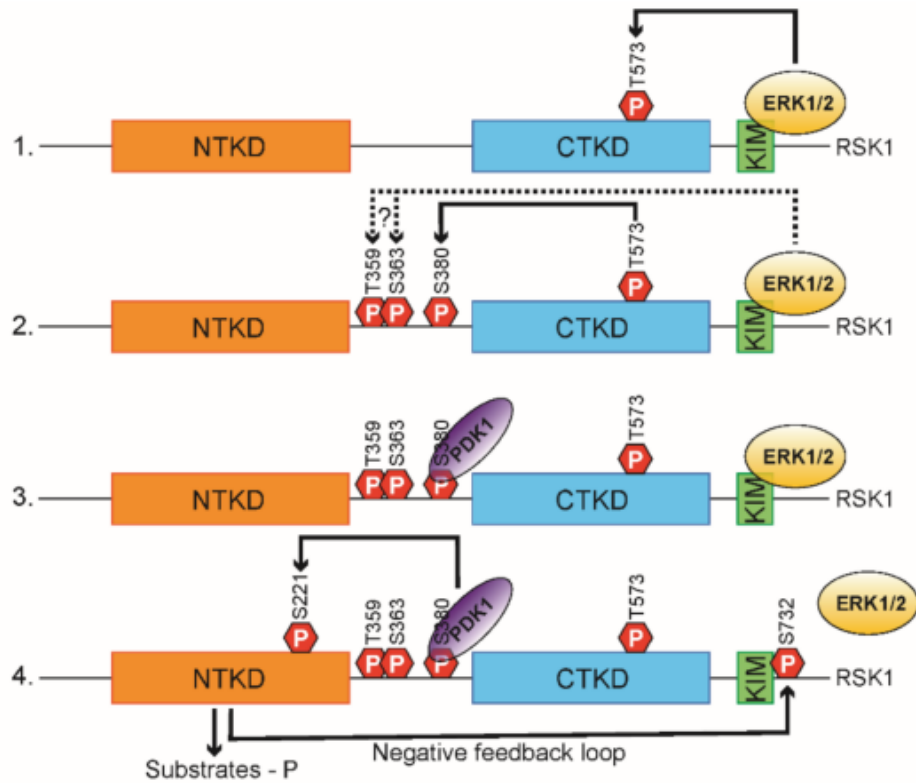
RSK izoformları her hücrede devamlı olarak ifade edilmektedir fakat RSK4 izoformu bu duruma dahil değildir. RSK4 çoğunlukla embriyonal gelişme sırasında ifade edilir [56]. Yeni çalışmalar RSK proteinleri izoformlara spesifik olarak görevlere sahip olabileceklerini göstermiştir [57, 58]. Buna göre;

RSK1, öncelikle akciğer, kemik iliği ve T hücrelerinde yüksek oranda ifade edilir. RSK2, özellikle T hücrelerinde, lenf nodlarında ve prostatta daha fazladır. RSK3, akciğer, beyin,

omurilik ve retina gibi dokularda yüksek ekspresyona sahiptir. RSK4 transkriptinin dokulardaki ekspresyonu, diğer izoformlara kıyasla çok daha düşüktür [54].

1.4.2 RSK geninin izoformlarının düzenlenmesi

RSK izoformları Raf/Ras/MEK/ERK sinyal yollarıyla direkt ya da indirekt olarak aktive edilebilirler. Bütün izoformların 6 adet fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Bunlar Ser221, Thr359, Ser363, Ser380, Thr573 ve Ser732'dir. Şekil 1.2'de RSK gen izoformlarının fosforile edildiği aminoasitleri ve konumları gösterilmektedir.



Şekil 1.2: RSK geni izoformlarının yapısı [54]

Normal hücrelerde RSK proteini inaktif ERK1/2 ile birlikte bir kompleks halinde bulunur. Bu hücreler uyarılınca ERK1/2, Thr573'ü ve dolayısıyla C-uç kinaz alanı (CTKD)'ni aktive eder ve CTKD'nin aktivasyonu da proteinin aktivasyonuna yol açar [59]. ERK1/2 ayrıca bağlanma bölgesinde bulunan Ser363 ve Thr359'u da fosforile edebilir. Tamamen aktive CTKD Ser380'i aktive eder ve bu aktivasyon, 3' fosfoinositid bağımlı kinaz1 (PDK1)'in bağlanmasına olanak sağlar. PDK1, RSK'daki N-uç kinaz alan (NTKD)'de bulunan Ser322'i fosforilleyerek NTKD nin aktive olmasına olanak sağlar [60, 61]. NTKD, aynı proteindeki KIM üzerinde bulunan Ser732yi fosforilleyebilir ve bu fosforillenme sonucunda

KIM bölgesinin ERK1/2 ye karşı olan afinitesini azaltabilir. Bu durum negatif geri beslemeye sebep olarak proteini durdurmaya yarar [62].

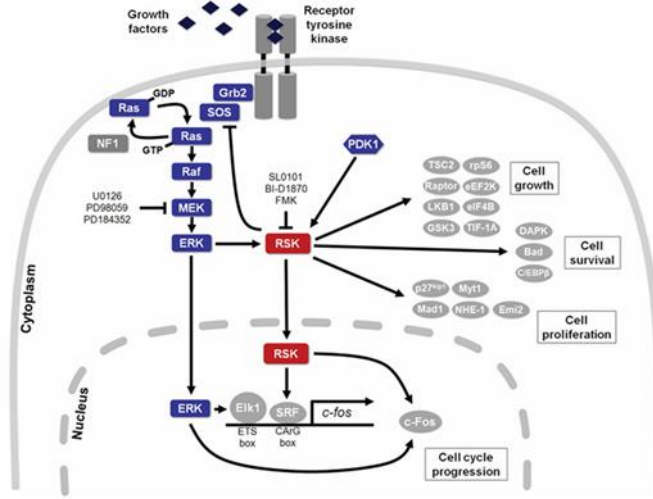
RSK proteinlerinin Protein fosfataz 2C delta (PP2C δ) proteinleri tarafından defosforile edilmesi de bir diğer inaktivasyon mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır [63]. Başka çalışmalar ise RSK'nın Mitogenle aktive olan bir protein kinaz (MAPK) yolağının etkisiyle veya fibroblast büyüme faktör reseptörü-3 (FGFR3) tarafından da aktive edilebildiğini ortaya çıkarmıştır [64-66].

1.4.3 RSK genlerinin aktivasyonu

Büyüme faktörlerinden biri olan EGF, hücre zarında yer alan reseptör tirozin kinazlardan EGFR'a bağlanarak sinyal iletimini başlatır. Reseptörün aktive olması, hücre içindeki çeşitli serin/treonin kinazların da aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon öncelikle Rat Sarcoma viral oncogene homolog (RAS)'un aktif forma geçmesini sağlar. RAS, GDP bağlı inaktif durumdan GTP bağlı aktif forma dönüşür ve diğer kinazların aktivasyonunu başlatır. Aktif RAS, bir serin/treonin kinaz olan Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (RAF)'yı uyarır. RAF, kendisinden sonra gelen MAPK/ERK Kinase (MEK)'i fosforilleyerek aktive eder. Ardından MEK, çekirdeğe geçebilen ve birçok genin ekspresyonunu etkileyen Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)'i fosforilleyerek sinyali iletir.

Aktive olmuş ERK, yalnızca sitoplazmada değil, çekirdekte de görev yapar. Burada çeşitli transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek hücrenin büyüme, farklılaşma ya da hayatta kalma gibi süreçlerine yön verir. Bunun yanında, ERK'in etkilediği önemli hedeflerden biri de RSK'dır. RSK, hem ERK tarafından doğrudan hem de PDK1 aracılığıyla fosforilendikten sonra aktif hale gelir. Aktif RSK, çekirdek içindeki çeşitli transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek genetik düzeyde hücrel yanıtın şekillenmesine katkıda bulunur [51]. FBJ fare osteosarkom viral onkojeni homologu (c-Fos) ve Nükleer reseptör alt ailesi 4 (Nur77) gibi transkripsiyon faktörlerinin regülasyonlarını sağlayarak birçok mRNA'yı aktifleştirip transkripsiyonu uyardığı bilinmektedir [67].

Normal şartlarda PDK1 bağlanabilmek için PH domaini gerektirir, ancak RSK için bu durum geçerli değildir. RSK proteini N-uç bölgesinde bu fosforillenmeyi kolaylaştıran bir fosfat bağlama cebi içerir. Bu cep PDK1 tarafından fosforillenmeyi uyarır [48].



Şekil 1.3: RAS/MAPK yolağının RSK proteinini aktive şeması [51]

1.5 RSK proteinlerinin görevleri

RSK proteinini hücre içinde çok fazla role sahiptir.

1.5.1 Protein sentezi

RSK proteinlerinin protein sentezi aşamasında birçok görevi vardır. Bunlardan ilki memeli rapamisin hedefi (mTOR) yolağının regüle edilmesidir. RSK proteinleri hücre içerisinde bulunan Tuberous Sclerosis Complex 2(TSC2)'yi fosforilleyerek mTORC1'e dönüştürür bu durum translasyonu artırır. Ayrıca RSK3 proteini glikojen sentaz kinaz 3 (GSK) enzimini fosforilleyerek etkisini düşürür ki bu durum da eIF2B transkripsiyon faktörünün uyarılmasına sebep olur [68]. Ayrıca RSK1 ve RSK2 eIF4B yi de fosforilleyerek translasyonun başlamasına sebep olarak büyüme ve hayatta kalma ile ilgili olan transkripsiyonların başlamasını sağlar [69]. Bunların yanısıra 40S ribozomal protein S6 (40S rpS6)'yı da fosforile ederek translasyonu pozitif anlamda regüle ederler [70].

1.5.2 Hücre döngüsü ve proliferasyon

Hücre döngüsünde de RSK'nın birden fazla görevi bulunmaktadır. Bunlardan ilki c-Fos, GSK3 ve p27'yi fosforile ederek hücre siklusunun G1 evresinin regülasyonunu sağlamaktır. c-Fos'un RSK2 tarafından regüle edilmesi ve bunun sonucunda oluşan siklin D1 ekspresyonu G1-S geçişi için gerekli bir olgudur [71].

p27'nin fosforilasyonu ise RSK1 tarafından yapılır ve siklin E kompleksinin üzerindeki inhibisyonu baskılamaktadır [72]. Aynı zamanda GSK3'ü baskılayarak, M evresinden G1 evresine geçişine katkı sağlar [73]. Bunların yanında CDK1-siklin B kompleksi aktivasyonunda görev alan Cell Division Cycle 25C (CDC25C)'yi de aktive ederek G2-M geçişini indüklerler [74].

RSK'ların proliferasyon baskılayıcı bir protein olan Max Dimerizasyon Protein 1'i (Max1) fosforilleyerek proliferasyonu indüklediği bilinmektedir. Bu proteinin fosforillenmesi de grede olmasına ve proliferasyonu baskılayamamasına neden olmaktadır [75].

1.5.3 Hücre hayatta kalması

RSK proteininin fosforilasyon görevi pro-apoptotik mekanizmalarda da etkilidir. RSK proteini bazı proapoptotik proteinleri fosforile ederek bu yolları durdurabilir. Bunlara örnek olarak B Hücreli Lenfoma 2 (BCL-2) yolağındaki Hücre Ölümüyle İlişkili BCL2 ile Bağlantılı Agonist (BAD) proteini ve Death Associated Protein Kinaz (DAPK) söylenebilir. Bu fosforilasyonlar bu proteinlerin inaktive olmasına sebep olmaktadır [76]. Bununla birlikte RSK proteinleri CCAAT/enhancer binding protein beta'yı (C/EBP β) fosforilleyerek kaspaz aktivitesini de düşürür [77]. Bu fosforilasyon sonucunda Kaspaz 1 ve Kaspaz 8 inaktive olur. Bu şekilde kaspaz bağımlı apoptoz yolağıının aktivitesi düşmüş olur. Ayrıca RSK'nın aktive ettiği cAMP Yanıt Elementi Bağlayıcı Protein (CREB), BCL-2, BCL-XL ve MCL-1 gibi hayatta kalma genlerinin üretimini indükleyerek hücreyi hayatta kalması için uyarır [78].

1.5.4 Hücre hayatta kalması

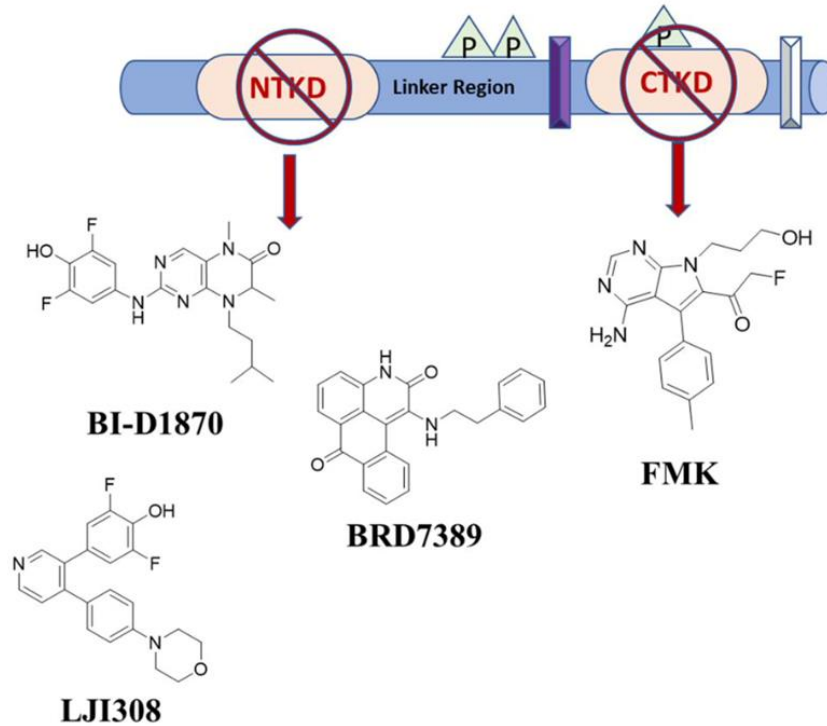
RSK'ları aktive eden ERK1/2 bir transkripsiyon faktörü olan Fos Bağımlı Antijen 1 (FRA1)'i fosforile ederek Integrin, Laminin332, matriks metalloproteinaz ve Rac1 gibi pro metastatik genlerin üretimini indükler [79]. İntegrinler, Laminin-332, matriks metalloproteinazlar ve Rac1, hücre adezyonu, ECM yıkımı ve hücre iskeleti yeniden düzenlenmesi yoluyla tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazını kolaylaştıran birbirini tamamlayıcı mekanizmalarla etki gösterir [79]. Ayrıca FilaminA'yı da fosforile ederek hücre göçünü uyarır [80]. Son olarak da RSK'lar SH3 Domaini İçeren Protein (SH3P2)'yi fosforilasyonla inaktive ederek hücre göçünü negatif anlamda etki edebilir [81].

1.6 RSK proteinleri ve kanser

RSK geninin anormal bir şekilde ifade edilmesi kontrol edilemeyen proliferasyona ve metastaza yol açabilmektedir. Bununla birlikte RSK'ların Kontrol noktası kinazı 1 (Chk1) ve Mayotik rekombinasyon 11 homolog A (Mer11) gibi her iki kontrol noktasında da görev alan proteinleri etkilediği ve DNA hasarından dolayı oluşabilecek sinyalleri baskılayabildiği de bulunmuştur. Bu durum kanser kemodirencine neden olabilmektedir [82].

RSK izoformlarının kanserde de fonksiyonel farklılıklar gösterdiği doğrulanmıştır [83]. RSK1/2, kanser hücrelerinin büyümesinde, proliferasyonunda ve hayatta kalmasında etkili rol oynar. Bu genlerin ifadesi veya aktivasyonunun birçok kanser hücresinde arttığı gözlemlenmiştir [84]. Bunun tersine RSK3/4 ün ifadesi tümör baskılayıcı bir etki oluşturabilir. Kanser hücrelerinde bu genlerin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir [54]. RSK4 ün azalan ifadesi kolorektal kanserde teşhis koymada bir ölçüt olabilmektedir [85]. RSK4 ün aşırı ekspresyonu hücreyi G0-G1 fazında duraklatacağından meme kanserinde proliferasyonu azalttığı görülmüştür [86].

1.7 RSK inhibitörleri



Şekil 1.4: RSK1-NTKD ve CTKD'yi hedef alan bazı bilinen inhibitörlerin kimyasal yapıları [87]

RSK'lar birçok kanser yolaklarına olan etkisinden dolayı ilişkili olduğundan bu genlerin inhibisyonunun da birçok hastalığın tedavisinde etkili olabileceği bir gerçektir. N-uç veya C-uçlarını etkileyen birçok RSK inhibitörü de bulunmaktadır (Şekil 1.5) [88]. Bahsedilen halihazırdaki inhibitörlerin hiçbirisi kanser tedavisinde *in vivo* kullanımda etkili seçenekler değildir. Bunun sebebi olarak, bu inhibitörlerin birden fazla izoformu inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha spesifik inhibitörlerin daha etkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır [54]. RSK1-NTKD ve CTKD'yi hedef alan bazı bilinen inhibitörlerin açık yapıları Şekil 1.5'te verilmiştir.

1.7.1 SL0101

Flovonol rhamnosidi olan SL0101 hücre zarından geçebilen bir kaemperfol glikozididir. *Fosteronia refracta* bitkisinden izole edilmiştir. RSK1 ve RSK2 izoformlarının N terminal bölgesini hedeflemektedir. Bunu yaparken diğer AGC kinazlara karşı hiçbir etkisi bulunmamaktadır [79, 89]. SL0101'in MCF-7 kanser hattında kanser hücresi büyümesini durdurabildiği gözlenmiştir ancak yüksek EC₅₀ değeri ve düşük kararlılık gözlenmiştir [89]. Farmakokinetik özelliklerinin düşük kalması ve hedeflenenin dışında etki gösterebilmesinden dolayı kullanılmamaktadır.

1.7.2 BI-D1870

Dihidropteridinon BI-D1870 N-ucu hedefleyen bir ATP antagonisti RSK inhibitörüdür [90]. BI-D1870'in tüm RSK izoformlarını durdurabilme yetisi vardır ve tüm AGC kinazları içerisinde RSK spesifik bir inhibitördür. Fakat bu inhibitör Polo benzeri kinaz 1 (PLK1) isimli polo benzeri kinaz proteinini de aynı düzeyde etkili bir şekilde inhibe etmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise Maternal Embriyonik Lösin Zipper Kinaz (MELK), Provirüs Entegrasyonlu Moloney Bölgesi 3 (PIM3) gibi başka proteinleri de inhibe edebilmektedir [91]. 4 RSK izoformu içinde BI-D1870'in RSK3 ve RSK4 izoformlarına etkisinin daha fazla olduğu saptanmıştır [90]. Aynı şekilde BI-D1870'in de SL0101 gibi nonspesifik etkileri ve yetersiz farmakokinetik özellikleri bulunmaktadır [92].

1.7.3 LJH685 ve LJ308

LJH685 ve LJ308, BI-D1870'in diflorofenil piridin türevleridir. Bütün RSK izoformlarına karşı etkilidirler ve BI-D1870'e nazaran daha az sayıda hedef dışı etkiye sahiptirler [93]. Fakat yapılan bazı çalışmalarda LJH685'in düşük yarılanma ömrünün olduğu ve farelerde etkisinin az olduğu bildirilmiştir [94].

1.7.4 BIX02565

BIX02565 RSK2 genini hedefleyen bir inhibitördür [95]. Diğer RSK izoformları üzerindeki etkisi hala bilinmemektedir. RSK2 dışında da, CLK2, PDGFR gibi birçok gen üzerinde de hedef dışı etkiye sebep olduğu bilinmektedir [96]. Bunların dışında da fareler üzerinde yapılan deneylerde tansiyonu ve kalp atış hızını da önemli ölçüde düşürdüğü görülmüştür [97].

1.7.5 BRD7389

BRD7389 inhibitörü çeşitli RSK'ları aktive ederek insülin ifadesini azaltan ve pankreatik alfa hücrelerini pankreatik beta hücrelerine dönüştüren bir inhibitördür [98].

1.7.6 FMK

Florometilketon olarak adlandırılan ve geri dönüştürülemeyen bir inhibitör olan FMK C-Terminalde bulunan ATP bağlanma bölgesindeki sistein kalıntılarına bağlanarak çalışmaktadır [99]. Bu durum Ser386 bölgesindeki fosforilasyonu inhibe ederek RSK2'nin sinyalini negatif şekilde etkilemektedir. Aynı zamanda bu inhibitör Lenfositlere özgü protein tirozin kinaz (Lck), Sarkom kinazı veya Rous sarkom virüsü homolog tirozin kinaz (Src), EPH reseptörü A2 (EPHA2) ve Ribozomal protein S6 kinaz beta-1 (S6K1)' i de yüksek konsantrasyonlarda iken inhibe eder [100]. Fakat bu inhibitör RSK'yı sadece C terminali aktivasyonu üzerinden inhibe etmektedir. N terminal aktive olduktan sonra etkisiz kalmaktadır [54].

1.7.7 PMD-026

PMD-026 oral kullanıma uygun olan ilk RSK inhibitörüdür. Meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir [101]. *In vitro* çalışmalarda RSK'nın tüm izoformlarına yüksek oranda spesifik bir hedefleme sağladığı görülmüştür. Ayrıca fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarda ise yüksek doğrulukta kanser hücrelerini hedeflediği saptanmıştır. Bunların yanında fare ve köpeklerde yapılan çalışmalarda herhangi bir kardiyotoksisiteye, nötropeniye veya oküler toksisiteye sebep olmamıştır. Ayrıca prelinik çalışmalarda tek başına ve konvansiyonel kemoterapötiklerle kombine şekilde çalışabildiği de bulunmuştur [54].

1.8 RSK ekspresyon düzeyleri ve kolon kanseri prognozundaki önemi

Genel olarak RSK izoformları birbirine karşı yüksek benzerlikler gösterse de N- ve C-terminallerindeki farklılıklar spesifik fonksiyon farklılıklarına neden olmaktadır [102]. RSK1 izoformunun mRNA düzeyinde ifadesine bakılırsa en fazla olarak akciğer, pankreas, böbrekler, kemik dokusu ve T hücrelerinde ifade edildiğini gösterilmiştir.

RSK2'ye baktığımızda ise çoğunlukla lenf düğümlerinde, T hücrelerinde ve prostat dokusunda ifade edildiği bilgisi bulunmaktadır. RSK3 izoformuna bakıldığında genel olarak akciğer ve iskelet kaslarında yoğunlaştığı ifade edilmektedir [103]. Bu üç izoformdan farklı olarak RSK4 ifadesi daha çok embriyonik çağda gözlenmektedir, yetişkin bireylerde vücutta çok az ifade edilmektedir, bazı kanserlerde ifadesinin arttığı gözlenmiştir [51, 56].

RSK proteinlerinin ifadelerinin kolorektal kanserle ilişkili olduğu bulunmuştur. Bir çalışmada Tümör nekroz faktörü reseptörü ilişkili faktör 2 (TRAF2) ve RSK2 proteininin kolorektal kanserde aşırı ifadesine rastlanmıştır [104]. Bundan dolayı RSK2 ve TRAF2 proteinlerinin ifadesinin kolorektal kanser teşhisinde önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Kolorektal kanserde RSK4'ün normal düzeylerden daha düşük olduğu görülmüştür. Fakat normal düzeyden daha fazla ifade edildiği durumlarda daha kötü bir prognoza sahip olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı RSK4 ekspresyonunun tümör prognozunda yardımcı olabileceği düşünülmektedir [85].

RSK4'ün kolorektal kanser hücrelerinin ölümsüz olmasında etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir [105]. RSK4'ün eliminasyonunun, p53'ün hücre döngüsünü durdurma etkisini baskıladığı ve siklin bağımlı inhibitör p21'in ifadesini azalttığı bulunmuştur. Ayrıca RSK4'ün inhibisyonunun kolorektal kanser hücrelerini DNA hasarıyla, oksidatif stresle ve onkogen aktivasyonu ile yaşlandırdığı ortaya çıkmıştır [106]. Bunlardan dolayı RSK4, proliferasyonu baskılayan bir tümör baskılayıcı gen olarak davranmaktadır [105].

Çalışmalar RSK2'nin T-box transkripsiyon faktörü TBX21 (T-bet)'i fosforilleyerek metastazı azalttığını ve kolon kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlattığını göstermiştir. RSK2'nin yokluğu interferon gamma sitokininin hücre dışına salgılanmasını yüksek ölçüde azaltmaktadır. Bunun sebebi, IFN-g geninin ekspresyonunu düzenleyen T-bet transkripsiyon faktörünün uygunsuz şekilde fosforillenmesidir. Azalan IFN-gamma düzeyleri immün sistem baskısını inhibe edebilir ve bu durum karaciğer ya da akciğer metastazına sebep

olabilir. Yani RSK2'nin varlığı RSK2/T-bet/IFN-gamma yolağını aktive ederek kolon kanserinin ve kolon kanseri metastazının baskılanmasında önemli bir rol oynamaktadır [107]. Ayrıca yapılan bir çalışmada RSK4 geninin EMT geçişini indükleyebildiği düşünölmektedir. Bu yolla metastazı inhibe ettiği düşünölmektedir [108].

2. TEZİN AMACI

Yapılan çalışmalar sonucunda kolon kanseri hücre hatlarında RSK geninin ifadesinin arttığı bildirilmiştir. Daha önceden keşfedilen RSK inhibitörleri üzerinde ise potansiyel ilaç çalışmaları yapılmıştır ancak ileri çalışmalar için istenen sonuçlar alınamamıştır. Bu tez çalışması ile TÜSEB projesi kapsamında *in siliko* keşfedilen ve satın alınan inhibitör adaylarının *in vitro* aktivitelerinin belirlenmesi üzerine çalışmaların gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Buna göre;

Alt amaç 1: Kolon kanseri hücrelerinde (SW480 ve HT-29) total RSK ifadesinin gösterilmesidir. Birinci basamakta, kolon kanseri hücrelerinin normal koşullarda RSK genini içerip içermediğini kontrol etmek için, uygulama yapılmadan önce hücre hatlarından protein ekstraksiyonu sağlanmış ve Western Blotting yöntemi ile hücre protein eldesi içerisindeki RSK proteini gösterilmiştir.

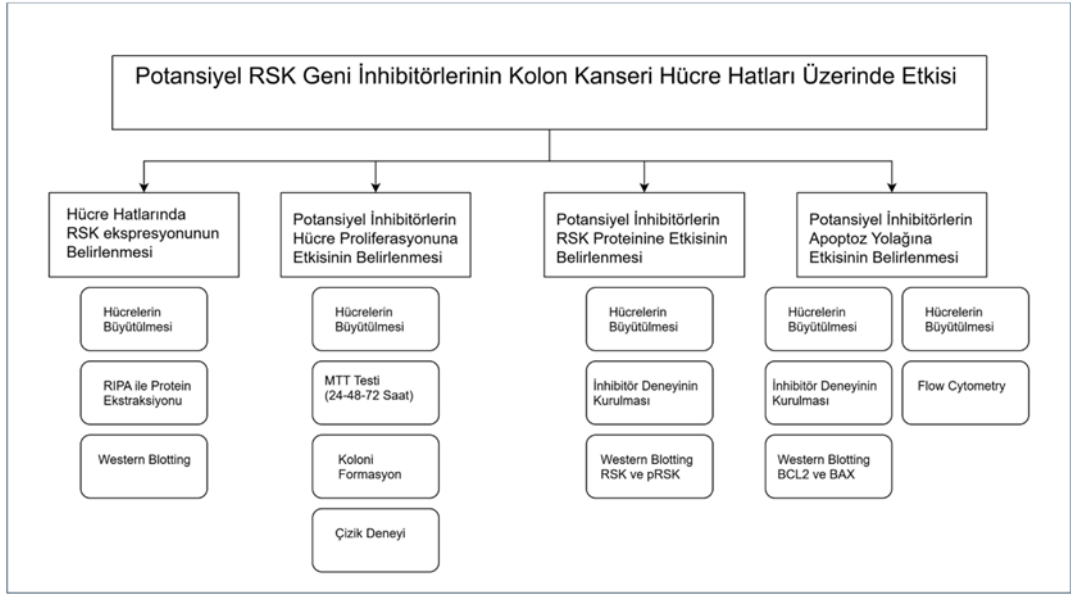
Alt amaç 2: Temin edilen potansiyel RSK inhibitör adaylarının kolon kanseri hücreleri (SW480 ve HT-29) üzerine gösterdiği sitotoksik etkinin gösterilmesidir. Bu etki sağlıklı model olan HUVEC hücrelerinde kıyaslanarak analiz edilmiştir.

Bu basamakta hücreler büyütüldükten sonra potansiyel inhibitör adaylarının hücre üzerindeki toksisitesinin belirlenebilmesi için MTT testi analizi gerçekleştirildi. Aynı zamanda hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenebilmesi için koloni formasyon ve çizik deneyleri yapıldı.

Alt Amaç 3: Potansiyel inhibitör adaylarının aktivitesinin belirlenmesidir. Bu amaçla inhibitör adayları uygulama sonrasında kısa ve uzun saat zaman dilimlerinde RSK aktivitesine etkisinin belirlenmesi için gereken dozlarda ve sürelerde inhibitör uygulandıktan sonra protein eldesi yapıldı. RSK ve pRSK protein antikoları kullanılarak fosforillenmiş pRSK ve RSK protein ifadesine bakıldı.

Alt Amaç 4: Sentezlenen potansiyel inhibitörlerin apoptotik aktivitesinin incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda kolon kanseri hücreleri üzerine belirli IC₅₀ dozu ve saat diliminde uygulanan potansiyel inhibitörlerin apoptotik ilişkisi BAX ve Bcl-2 protein seviyeleri ve flow sitometrede AnnexinV/PI analizi ile tespit edildi.

Bu amaçlar ışığında oluşturulan tez iş akış şeması Şekil 2.1’de verildiği gibidir.



Şekil 2.1: Tez iş akış şeması

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Materyaller

3.1.1 İnhibitör adaylarının belirlenmesi ve temini

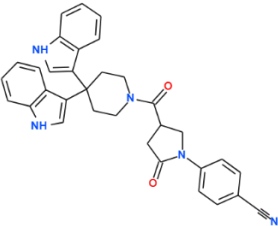
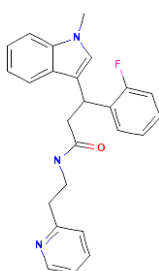
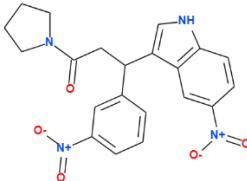
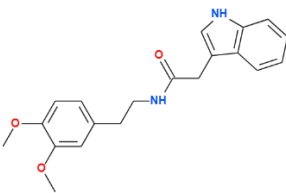
Potansiyel RSK1 ve/veya RSK2 inhibitör adayları Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi'nde Doç. Dr. Ferah CÖMERT ÖNDER'in yürütücülüğü'nde TÜSEB projesi (Proje No: 27777) kapsamında ve ayrıca projede yüksek lisans derecesine sahip yardımcı personel olarak görev alan Sevil KALIN'ın katkılarıyla *in siliko* analizler ile belirlenmiştir. Proje kapsamında *in vitro* çalışmaların gerçekleştirilmesi için potansiyel olabileceği belirlenen ve ChemDiv (10 adet) ve İnterBioScreen (1 adet) veritabanından satın alınan 11 adet RSK inhibitör adaylarının kodları aşağıda verilmiştir (Tablo 3.1).

- 6190-0389
- C592-3214
- D217-0222
- F688-0005
- S322-0083
- V030-2239
- V031-1748
- Y040-3184
- Y040-4759
- Y206-0033
- STOCK1N-83113

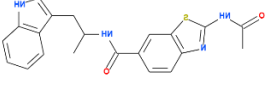
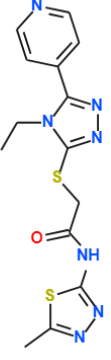
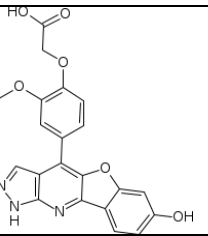
Tablo 3.1: *In-vitro* çalışılan bileşiklerin açık yapıları ve özellikleri

No	ID	Bileşik ismi ve Özellikleri	2B Yapısı
1	6190-0389 (ChemDiv)	<p>1-(4-Amino-1,2,5-oksadiazol-3-yl)-<i>N'</i>-[(2,4-dihidroksifenil)metilidene]-5-etil-1H-1,2,3-triazol-4-karbohidrazid</p> <p>Molekül ağırlığı (g/mol): 358.31 Molecular Formula: C₁₄H₁₄N₈O₄ Smiles: <chem>CCc1c(C(N/N=C/c2ccc(cc2O)O)=O)nnn1c1c(N)non1</chem> logP: 1.291 logD: 1.2783 logSw: -2.2099 Hidrojen bağ alıcı: 10 Hidrojen bağ verici: 5 Polar yüzey alanı: 152.32</p>	
2	C592-3214 (ChemDiv)	<p>3-Fluoro-<i>N'</i>-[4-(3-metilfenil)-5-(2-okso-2-[(1,3-tiyazol-2-il)amino]etil)sülfanil]-4H-1,2,4-triazol-3-yl]metil}benzamid</p> <p>Molekül ağırlığı (g/mol): 482.56 Molekül Formülü: C₂₂H₁₉FN₆O₂S₂ Smiles: <chem>Cc1cccc(c1)n1c(CNC(c2cccc(c2)F)=O)nn1SCC(Nc1ncsc1)=O</chem> logP: 3.3501 logD: 3.3497 logSw: -3.65 Hidrojen bağ alıcı: 8 Hidrojen bağ verici: 2 Polar yüzey alanı: 84.001</p>	
3	D217-0222 (ChemDiv)	<p>2-(2-Klorofenil)-5-(hidroksimetil)-<i>N'</i>-[(piridin-2-il)metil]-2H-1,2,3-triazol-4-karboksamid</p> <p>Molekül ağırlığı (g/mol): 343.77 Molekül Formülü: C₁₆H₁₄ClN₅O₂ Smiles: <chem>C(c1ccccc1)NC(c1c(CO)nn(c2ccccc2[Cl])n1)=O</chem> Stereo: achiral logP: 1.2264 logD: 1.2261 logSw: -2.0984 Hidrojen bağ alıcı: 6 Hidrojen bağ verici: 2 Polar yüzey alanı: 77.378</p>	
4	F688-0005 (ChemDiv)	<p>2-([5-(4-Metilfenil)-4H-1,2,4-triazol-3-il]sülfanil)metil)-4-okso-1,4-dihidrokuinolin-6-karboksamid</p> <p>Molekül ağırlığı (g/mol): 391.45 Molekül Formülü: C₂₀H₁₇N₅O₂S Smiles: <chem>Cc1ccc(cc1)c1nnc([nH]1)SCC1=CC(c2ccccc2N1)C(N)=O</chem> Stereo: achiral logP: 2.6929 logD: 1.5163 logSw: -3.2647 Hidrojen bağ alıcı: 7 Hidrojen bağ verici: 4 Polar yüzey alanı: 91.327</p>	

Tablo 3.1 (devam)

5	S322-0083 (ChemDiv)	<p>4-{4-(4,4-Di(1H-indol-3-il)piperidin-1-karbonil]-2-oksopirolidin-1-il}benzonitril</p> <p>Molekül ağırlığı (g/mol): 527.63 Molekül Formülü: C₃₃H₂₉N₅O₂ Smiles: <chem>C1C(CN(C1=O)c1ccc(C#N)cc1)C(N1CC(C(C1)(c1c[nH]c2ccccc12)c1c[nH]c2ccccc12)=O</chem> Stereo: racemic mixture logP: 4.6821 logD: 4.6821 logSw: -4.6439 Hidrojen bağ alıcı: 5 Hidrojen bağ verici: 2 Polar yüzey alanı: 69.891</p>	
6	V030-2239 (ChemDiv)	<p>3-(2-Florofenil)-3-(1-metil-1H-indol-3-il)-N-(2-(piridin-2-il)etil)-22-propenamit</p> <p>Molekül ağırlığı (g/mol): 401.49</p>	
7	V031-1748 (ChemDiv)	<p>3-(5-Nitro-1H-indol-3-il)-3-(3-nitrofenil)-1-(pirolidin-1-il)propan-1-on</p> <p>Molekül ağırlığı (g/mol): 408.41 Molekül Formülü: C₂₁H₂₀N₄O₅ Smiles: <chem>C1CCN(C1)C(CC(c1cccc(c1)[N+](=[O-])=O)c1c[nH]c2ccc(cc12)[N+](=[O-])=O)=O</chem> logP: 3.9164 logD: 3.9164 logSw: -4.1105 Hidrojen bağ alıcı: 10 Hidrojen bağ verici: 1 Polar yüzey alanı: 93.088</p>	
8	Y040-3184 (ChemDiv)	<p>N-(2-(3,4-Dimetoksifenil)etil)-2-(1H-indol-3-il)asetamit</p> <p>Molekül ağırlığı (g/mol): 338.4 Molekül Formülü: C₂₀H₂₂N₂O₃ Smiles: <chem>COc1ccc(COC)cc1OCCNC(Cc2c[nH]c3ccccc23)=O</chem> Stereo: achiral logP: 2.1677 logD: 2.1677 logSw: -2.8367 Hidrojen bağ alıcı: 4 Hidrojen bağ verici: 2 Polar yüzey alanı: 49.411</p>	

Tablo 3.1 (devam)

9	Y040-4759 (ChemDiv)	2-Asetamido-N-(1-(1H-indol-3-il)propan-2-il)-1,3-benzotiazol-6-karboksamit Molekül ağırlığı (g/mol): 392.48 Molekül Formülü: C ₂₁ H ₂₀ N ₄ O ₂ S Smiles: <chem>CC(Cc1c[nH]c2ccccc12)NC(c1ccc2c(c1)sc(NC(C)=O)n2)=O</chem> logP: 3.6103 logD: 3.6102 logSw: -3.8586 Hidrojen bağ alıcı: 5 Hidrojen bağ verici: 3 Polar yüzey alanı: 66.987	
10	Y206-0033 (ChemDiv)	2-((4-Etil-5-(piridin-4-il)-4H-1,2,4-triazol-3-il)sülfanil)-N-(5-metil-1,3,4-thiadiazol-2-yl)asetamit Molekül ağırlığı (g/mol): 361.44 Molekül Formülü: C ₁₄ H ₁₅ N ₇ O ₂ S Smiles: <chem>CCn1c(c2ccncc2)nnc1SCC(Nc1nnc(C)s1)=O</chem> logP: 1.4076 logD: 1.3563 logSw: -1.8678 Hidrojen bağ alıcı: 8 Hidrojen bağ verici: 1 Polar yüzey alanı: 79.894	
11	STOCK1N-83113 (İBS)	2-(4-(7-Hidroksi-1H-benzofuro[3,2-b]pirazol[4,3-e]piridin-4-il)-2-metoksifenoksi)asetik asit Molekül ağırlığı (g/mol): 405.36	

3.1.2 Laboratuvar cihazları

Deneysel faz ilerlerken deneylerin yapılması için farklı solüsyonlar ve cihazlara ihtiyaç duyulmuştur. Kalibrasyonları ve kontrolleri sağlanan cihazların markaları Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Cihaz listesi

Cihaz İsmi	Tedarikçi Marka
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Vorteks	Velp Scientifica
SDS-PAGE Malzemeleri	BioRad
Elektroforez Güç Ünitesi	ThermoScientific
Saf Su Cihazı	Human Corp
Spektrofotometre, µDrop Plate	MultiscanGo
Buzdolabı (-20, +4)	Arçelik
Mikrodalga	Arçelik
-80 Derin Dondurucu	ThermoScientific
Inverted /Floresan Mikroskop	Nikon
Su Banyosu	Elektromag
Ultasonik Su Banyosu	PlusLab
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Laminar Air Flow	Telstar Bio II
pH Metre	Hanna
Buz Üretme Makinesi	Hoshizaki
Elektronik Hassas Terazî	Sartorius
Flow Sitometre Cihazı	Guava EasyCyte
Otomatik Pipetler	Thermo, Eppendorf
Döner Çalkalayıcı	ThermoScientific
Yatay Çalkalayıcı	ThermoScientific

3.1.3 Kullanılan kimyasallar

Deneylerin devamı sağlanırken kullanılan malzemelerin listesi Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan malzeme listesi

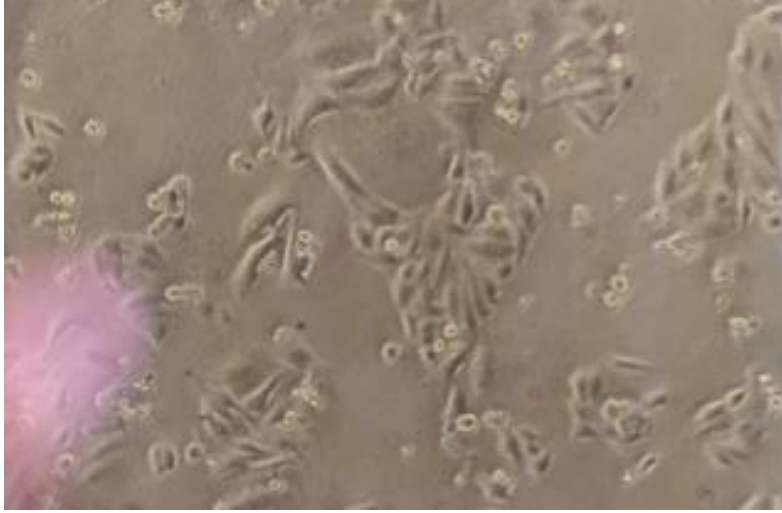
Malzeme Adı	Tedarikçi Marka
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco
DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium)	EuroClone
Tween-20	Thermo Fisher Scientific
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma Aldrich
Proteaz İnhibitör Tabletleri	Roche
APS (Amonyum Persülfat)	Merck
Akrilamid/Bisakrilamid (%40)	Merck
Pastör Pipeti	IsoLab
Antibiyotik-Antimikotik Ajan	Gibco
Penisilin-Streptomisin Solüsyon	HyQ
CaCl ₂ (Kalsiyum Klorür)	Sigma
MTT Solüsyon Tozu	Sigma
Tripsin	Sigma
Tris Base	Sigma
Tripan Mavisi	Sigma
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Thermo Fisher Scientific

Tablo 3.3 (devam)

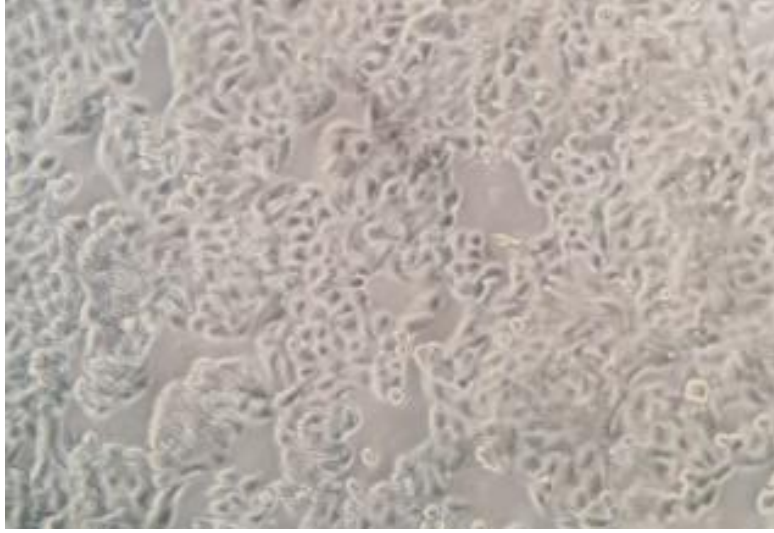
Kristal Viyole/ Metanol	Carlo Erba
0.22 µm, 0.45 µm Filtre	Sartorius
15 mL ve 50 mL Santrifüj Tüpü	IsoLab
100 mm'lik Kültür Petrisi	EuroClone
6, 12, 24, 48 ve 96 Kuyulu Hücre Plakası	Sarsedt
1.5 mL/2 mL Ependorf	IsoLab
PBS (Phosphate Buffer Saline)	VWE Life Science
Proteaz İnhibitör Tabletleri	Roche
APS (Amonyum Persülfat)	Merck
Tween 20	Thermo
Tris, Borik Asit, EDTA	Sigma
4X Laemmli Boya	BioRad
Protein Marker	Thermo
TEMED	Sigma
Coomassie Brilliant Blue	Sigma
HCl, İzopropanol	Sigma
EGTA, SDS, Glisin, NaCl	Sigma
PVDF Membran	Millipore
ECL	ThermoScientific
Metanol, Etanol	Merck

3.1.4 Kullanılan hücre soyları

Kolon kanseri çalışmaları kapsamında SW480 (Şekil 3.1) ve HT-29 (Şekil 3.2) hücre hatları tercih edildi. Deneysel kısımda sağlıklı hücre hattı olarak ise insan sağlıklı deri hücre hattı olan HUVEC (Şekil 3.3) hücre hattı tercih edildi.



Şekil 3.1: SW480 hücre hattı



Şekil 3.2: HT-29 hücre hattı



Şekil 3.3: HUVEC hücre hattı

3.2 Yöntemler

3.2.1 Laboratuvar temizlenmesi ve malzeme sterilizasyon aşaması

Laboratuvarın haftalık temizlik rutininde çamaşır suyu, %70 etil alkol ve virkon içeren dezenfektanlar kullanılmıştır. Hücre kültürü laboratuvarında ise sterilizasyon ve dezenfeksiyon amacıyla çeşitli uygulamalara başvurulmuştur.

Ultraviyole (UV) lambalar, bakteri, mantar, virüs, ve diğer mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. Çalışmalara başlamadan önce hem laboratuvar alanının hem de laminar flow kabininin UV lambaları yaklaşık 30 dk süreyle çalıştırılarak sterilizasyon sağlanmıştır. Havadan gelebilecek kontaminasyonların önlenmesi için ise HEPA filtreli cihazlar kullanılmış; ayrıca ortam haftada bir kez virkonlu su ve sodyum hipoklorit çözeltisi ile dezenfekte edilmiştir.

Isıya dayanıklı laboratuvar malzemeleri ve çözeltiler, 121°C'de 20 dk boyunca otoklavda sterilize edilmiştir. Bu gruba ependorf tüpleri, pipet uçları ve bazı solüsyonlar dahildir. Otoklav işlemi sonrasında bu malzemeler 80°C'de etüvde kurutulmuştur. Isıya duyarlı çözeltiler ise 0.22 mikrometre gözenekli filtre edilerek sterilizasyonları sağlanmıştır.

3.2.2 Hücre kültürü teknikleri

HT-29, SW480 ve HUVEC hücreleri hücre kültürü aşamasında %10 FCS içeren DMEM içerisinde büyütüldü. Donuk olan iki hücre soyu 5 mL %10 FCS içeren DMEM kullanılarak 1000 rpm santrifüjde 5 dk boyunca çöktürüldü. Süpernatant kısmı atılarak 10 mL %10 FCS konsantrasyonlu DMEM ve %1 antibiyotik içeren medyum ile steril hücre kültürü petri kabında büyümeye alındı.

3.2.2.1 Hücre besiyerlerinin hazırlanması

Hücreler için %10 FCS içeren DMEM kullanıldı. İçerisine antibiyotik/antimikotik karışımı eklendi. Fosfat tamponlu tuzlu su (10X PBS) hazırlanırken PBS tabletleri, tedarikçiden alınan talimatlar ile, 100 mL dH₂O (10X) ile çözüldü. Otoklav kullanılarak 20 dk boyunca 120 °C de sterilize edildi. Distile su kullanılarak 10 kat dilüe edildikten sonra +4 derecede muhafaza edildi. Tripsin-EDTA (TE) hazırlanırken 1X PBS içerisine, %0.25 (w/v) tripsin ve 0.53 mM EDTA eklenerek, 0.22 µm'lik filtre yardımıyla sterilize edilerek hazırlandı. -20°C'de muhafaza edildi. Tripan mavisi boyası ise tripan mavisi konsantrasyonu %0.4 (w/v)

olacak şekilde 1X PBS kullanılarak hazırlandı. Oda sıcaklığında saklanmak üzere, 100 mL PBS içerisine 0.4 g tripan mavisi eklendi.

3.2.2.2 Hücrelerin pasajlanması

Hücreler yaklaşık %80 doluluk oranına ulaştığında pasajlanma aşamasına geçildi. Üzerindeki eski besiyeri dökülerek PBS ile 3 yıkama işlemi vasıtasıyla besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyden ayrılması için 3 mL TE uygulandı ve 37°C’de %5 CO₂ inkübatöründe kontrollü bir şekilde yüzeyden ayrılana kadar yaklaşık 3-4 dk bekletildi. Hücre yüzeyden ayrıldıktan sonra %10 FCS içerikli DMEM kullanılarak TE inaktive edildi. Sonrasında kaldırılan hücreler tekrardan çöktürülmek üzere 1000 RPM de 5 dk santrifüje götürüldü. Çöktürme işleminden sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve 3’e bölünerek 3 ayrı petriye 10 mL %5 FCS li DMEM ve %1 antibiyotik konsantrasyonu ile paylaştırıldı.

3.2.2.3 Hücrelerin dondurulması

Hücreler %80 doluluğa ulaştığında %10 TE kullanılarak petri kabından kaldırıldı. 100 µM DMSO ve 1 mL FCS ile çözülerek steril eppendorf tüplerinde parafilmlelenerek -80 °C derin dondurucu dolaba kaldırıldı.

3.2.2.4 Hücrelerin sayılması

Hücreler %10 TE ile kaldırıldıktan sonra %10 FCS DMEM kullanılarak süspansiyon edildi. Uzun pipetajlama ile homojen dağılım sağlandıktan sonra steril Pasteur pipeti ile 1 mL alınarak steril eppendorfa alındı. 10-100 mikrolitrelik pipet yardımıyla içerisinde 50 µL alınıp başka bir eppendorfa alındı. Üzerine aynı miktarda tripan mavi boyası eklenerek thoma lamı üzerine 10 µL olarak uygulandı ve inverted mikroskopta sayımı yapıldı. Hücreler sayıldıktan sonra aşağıdaki formül kullanılarak mililitre başına düşen hücre sayısı hesaplandı.

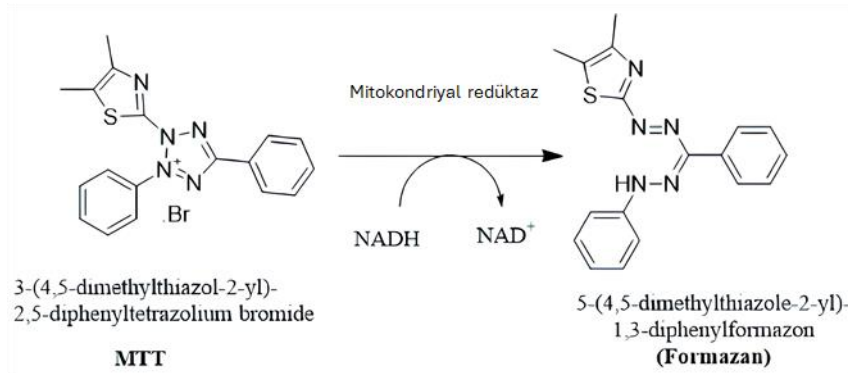
3.2.3 Sitotoksikite testi

MTT deneyinde kullanılan çözeltiler ve içerikleri Tablo 3.4’te verildiği gibidir. Uygulanan maddelerin sitotoksikitesinin belirlenmesi için MTT test kullanıldı. MTT testi formazan tuzunun formazana dönüşmesi prensibine dayanarak mor spektrumunölçülmesi sonucunda sitotoksikite belirleme testidir (Şekil 3.4).

Tablo 3.4: MTT deneyi çözeltisi hazırlanışı

Çözelti	İçeriği
MTT (5 mg/mL)	0.05 gram MTT tozu, 10 mL 1X PBS içerisinde tamamen çözülür. Elde edilen çözeltinin sterilizasyonu, 0.22 µm por çapına sahip bir filtre kullanılarak gerçekleştirilir. Hazırlanan solüsyon, -20 °C'de muhafaza edilir.
4 mM HCl konsantrasyonlu izopropanol	Son hacmi 500 mL olacak şekilde, 210 µL hidroklorik asit (HCl), izopropanol içerisine ilave edilerek karışım hazırlanır.

Hücreler 96 kuyucuklu plakaya kuyu başına başına 100 hücre gelecek şekilde paylaştırıldı. Her bir madde 5 ayrı konsantrasyonda 3 tekrar olacak şekilde uygulandı. 24, 48 ve 72 saat için ayrı ayrı ölçümler alındı. Ölçüm alınırken 200 µL toplam hacmin sadece medyumundan 100 ul çekilerek atıldı ve 10 µL MTT solüsyonu eklendi. Sonrasında morarma gerçekleşene kadar 4 saat boyunca 37°C'de CO₂'li inkübatörde bekletildi. Renk değişiminden sonra süpernatant kısım atılarak 100 µL %1 HCl içeren izopropanoik asit ile kaldırılarak pipetaj yapılarak çözüldü. Spektrofotometrede 550 nm'de değerler alındı. Formül yardımıyla hesaplamalar yapıldı.



Şekil 3.4: MTT bileşiğinin formazan tuzuna dönüşümü

MTT sonucuna göre %50 oranında hücreleri öldüren maddelerin IC₅₀ doz hesaplaması yapıldı AATBioquest (<https://www.aatbio.com/>) programı kullanılarak yapıldı.

3.2.4 Koloni formasyon deneyi

Hücre sayımı yapıldıktan sonra gerekli hesaplamalar yapılarak 6 kuyucuklu plakalara kuyu başına 1000 hücre gelecek şekilde hücreler bölündü. Hücrelerin yüzeye tutunmaları için 24 saat süre verildikten sonra IC₅₀ dozlarında etkili görülen maddeler uygulandı ve 37 derecede %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. 4 günde bir doz hatırlatması yapılarak 2 hafta boyunca inkübatörde koloni oluşturma süresi tanındı. İki hafta sonunda medyum uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS ile yıkanarak tamamen medyumdan arındırıldı. Metanol ile hücrelerin tamamen plakaya yapışması sağlandı, sonrasında kristal viyole boyası ile boyandı ve fotoğraflandırılması yapıldı. Koloni sayısı Cell Counter uygulaması ile sayılarak gerekli hesaplamalar ve oluşan koloni miktarları raporlandı.

3.2.5 Yaralanma (çizik) deneyi

Hücreler kaldırıldıktan sonra 6 kuyucuklu plakaya kuyu başına 30.000 hücre gelecek şekilde paylaştırıldı. Sonrasında hücrelerin tutunması için 24 saat süre tanındı. 24 saat sürenin sonunda hücrelere IC₅₀ dozunda madde uygulaması yapıldı. İnce pipet ucu kullanılarak eş yaralar açıldı ve 0, 3, 6, 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde fotoğraflaması yapıldı. Yaraların kapanma düzeyi Image J programı kullanılarak ölçüldü ve yüzde alan hesaplamaları yapılarak grafikler GraphPad prism 8.0 programı ile çizdirildi. % Alan formülü aşağıda gösterildiği gibidir.

3.2.6 Hücrelerden protein eldesi

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara paylaştırıldı ve erken (2 saat için) ve geç saat (72 saat) için ayrı, ayrı olmak üzere IC₅₀ dozunda uygulamaları yapıldı. Uygun saatlerde bekletildikten sonra hücrelerden RIPA solüsyonu kullanılarak protein kazıma işlemi gerçekleştirildi. RIPA çözeltilisinin hazırlanması Tablo 3.5'te gösterilmiştir Kuyulardaki besiyeri döküldü ve 3 kere PBS ile yıkama yapıldı. Sonrasında 100ul RIPA solüsyonu kullanılarak buz üzerinde 5 dk bekletildi ve kazıma işlemi gerçekleştirildi. Steril eppendorfa alınan hücre içeriği 2'şer dakika olarak 3 keze sonikasyona götürüldü ve parçalama işlemine devam edildi. Parçalama işleminden sonra 13500 rpm'de de 15 dk boyunca santrifüje götürülerek protein içeren süpernatantın eldesi sağlandı.

Tablo 3.5: RIPA hazırlanışı

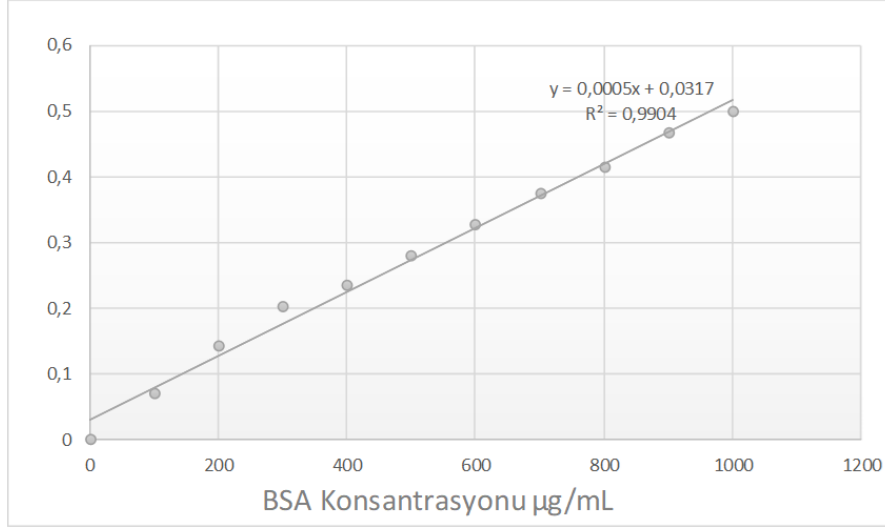
Çözelti	Hazırlanışı
RIPA	pH ayarı 8.0 olan 10 mM Tris-HCl, 1 nM EDTA, 140 mM NaCl, 1 mM EGTA %0.1 (w/v) SDS, SDS ile aynı oranda sodyum deoksikolat ve %1 (v/v) Triton X-100 içeren karışım hazırlanmıştır. Son hacme ulaşana kadar proteaz inhibitörü eklenmiştir. 2 mL hacmindeki eppendorf tüpleri ile -20°C’de stoklanmak üzere ayrılmıştır.

3.2.6.1 Protein miktar tayini

Elde edilen proteinlerin miktar tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Proteinler 2.5 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara alındı, Steril enjeksiyonluk su ile %100 oranında seyreltildi. Üzerine hazırlanan Bradford çözeltisinden 250 µL konularak aktifleşmesi için karanlık ortamda 10 dk boyunca bekletildi. Spektrofotometre kullanılarak 595 nm’de absorbansı alındı. Tablo 3.6’de bradford çözeltisi hazırlarken kullanılan yöntem verilmiştir. Şekil 3.4’de Bradford eğrisi gösterildiği gibidir. Eğri üzerinden protein hesaplaması yapılmaktadır. Protein hesabı için oluşturulan standart eğri grafiğinden elde edilen formül üzerine değerler yerleştirilir ve hesaplanmalar yapılır. Deneyler sırasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Tablo 3.6. Bradford hazırlanışı

Çözelti	Hazırlanışı
Bradford	0.1 gram Coomassie Brilliant Blue (G-250), 50 mL %95 etanol içerisinde tamamen çözülür. Ardından karışıma 100 mL %85 (w/v) fosforik asit ilave edilir. Elde edilen çözelti, saf su (dH ₂ O) ile 1 litreye tamamlanır. Hazırlanan çözelti, filtre kağıdından süzöldükten sonra ışık almayan bir şişeye aktarılır ve 4 °C’de saklanır.



Şekil 3.5: Bradford eğrisi grafiği ve denklemi

3.2.6.2 SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS PAGE deneyi hazırlanan protein örneklerinin elektrik akımı kullanılarak hareketine ve boyutlarına göre ayrılmasına dayanan bir metoddur. Çift fazlı jel sisteminde öncelikle ayırma jeli (alt jel) sabitlenmiş iki cam arasına döküldü. Jelin düz formda polimerleşebilmesi için %90 oranında izopropanol kullanılarak jelin düzleşmesi sağlandı. Jelin istenilen forma ulaşması için süre tanındıktan sonra üstteki izopropanol kurutma kağıtları yardımıyla alındı. Sonrasında yığılma jeli (üst jel) dökülerek taraklar yardımıyla protein örnekleri için küçük kuyucuklar oluşturuldu. Yığılma jeli de polimerleştikten sonra kuyucuklara zarar vermeden taraklar çıkarıldı ve jel camlarla birlikte 1X yürütme tamponu içeren jel elektroforezi tankına alındı.

3.2.6.3 Protein hazırlama

Elde edilen proteinlerin hesaplaması her kuyucuğa aynı miktarda (40 µg) protein gelecek şekilde yapıldı. Proteinler eppendorflara paylaştırıldıktan sonra 20 µL'ye tamamlanacak şekilde upper buffer eklemesi yapıldı. Sonrasında %10 Beta-merkaptöetanol içeren 4x laemmlı boyasından 5 µL her eppendorfa eklenerek 25 µL'ye tamamlandı ve proteinlerin denatüre olması için 95 derecede 5 dk bekletildi. SDS page jeline her kuyuya 20 µL olacak şekilde örnekler paylaştırıldı ve 80V elektrik gücü verilerek yürütme tamponu içerisinde 3 saat yürütme işlemi yapılarak proteinlerin boyutlarına göre ayrılması sağlandı. Ayırma jeli hazırlanması Tablo 3.7'da, yığılma jeli hazırlanması ise Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: 2 adet ayırma jeli hazırlanışı

Solüsyon	Miktar
TEMED	10 µL
dH ₂ O	5 mL
Lower Buffer	2.5 mL
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)	2.5 mL
%10 APS	100 µL

Tablo 3.8: 2 adet yığıma jeli hazırlanışı

Solüsyon	Miktar
TEMED	5 µL
dH ₂ O	50 µL
Upper Buffer	1.25 mL
Akrilamid-Bisakrilamid (37.5:1)	0.625 mL
%10 APS	3.07 mL

3.2.6.4 Western Blot deneyi

Western Blotlama deneyi hücre protein ekstraktının nicel olarak analizinin yapıldığı bir protein miktar tayin analizidir. Elektroforez, transfer, antikorlama, problama ve görüntüleme aşamalarından oluşmaktadır. Western Blot deneyinde kullanılan çözeltiler Tablo 3.9’da verilmiştir.

Proteinler boyutlarına göre jel içerisinde ayrıştırıldıktan sonra ıslak sandviçleme transfer yöntemi kullanılarak gece boyu 90mA akım ile PVDF membrana transferi gerçekleştirildi.

Tablo 3.9: Western blot deneyi çözeltileri

Çözelti	Hazırlanışı
10X TBS (Tris-Tuzlu Salın Tamponu)	24.22 gram Tris baz (Molekül Ağırlığı: 121.14) ve 87.66 gram sodyum klorür (NaCl, MW: 58.44), yaklaşık 700 mL saf su (dH ₂ O) içerisinde çözülür. pH değeri 7.5'e ayarlanır ve toplam hacim 1 litreye tamamlanır.
10X Elektroforez (Yürütme) Tamponu	30.3 gram Tris baz ve 144.4 gram glisin (MW: 75.07), yaklaşık 700 mL dH ₂ O'da çözülür. pH değeri 8.3 olarak ayarlanır ve hacim 1 litreye tamamlanır. Kullanım esnasında 1X olacak şekilde seyreltilir.
Ayırma Jeli (Alt Katman) Tamponu	18.17 gram Tris baz ve 0.4 gram SDS, 80 mL saf suda çözülür. pH değeri 8,8'e ayarlanır ve toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4°C'de muhafaza edilir.
Yığıma Jeli (Üst Katman) Tamponu Transfer Tamponu	6 gram Tris baz ve 0.4 gram SDS, 80 mL dH ₂ O'da çözülür. pH değeri 6,8 olacak şekilde ayarlanır. Hacim 100 mL'ye tamamlanır ve çözelti 4°C'de saklanır. 200 mL metanol ve 100 mL 10X yürütme tamponu karıştırılır. Üzerine saf su eklenerek hacim 1 litreye tamamlanır. Son olarak 500 µL %10 (ağırlık/hacim) SDS eklenir.
Jel Boyama Çözeltisi	0.1 gram Coomassie brilliant blue R-250, 50 mL metanol içinde çözülür. Ardından 10 mL asetik asit eklenir ve karıştırılır. Son hacim dH ₂ O ile 100 mL'ye tamamlanır.
1X TBST Çözeltisi	100 mL 10X TBS tamponu ile 1 mL Tween-20 karıştırılır. Karışıma dH ₂ O eklenerek toplam hacim 1 litreye tamamlanır.
Ponceau Boyası	0,1 gram ponceau-S, 100 mL %5 (hacim/hacim) asetik asit çözeltisinde tamamen çözülür.
4X Laemmli Boyası	277.8 mM Tris-HCl (pH 6.8), %44.4 oranında gliserol (hacim/hacim), %4.4 oranında LDS (veya SDS) ve %0.02 bromfenol mavisi içerir.

3.2.6.5 Antikorlama

Transferi gerçekleştirilen proteinlerin bulunduğu PVDF membran istenmeyen protein bağlanmalarının önüne geçilmesi için 1xTBST ile 3 kere 5 dk yıkandıktan sonra 1 buçuk saat boyunca %10 yağsız süt tozu içeren 1xTBST kullanılarak bloklamaya alındı. Bloklama işlemi tamamlandıktan sonra 3 kere 5er dk boyunca yıkama işlemi gerçekleştirildi ve ticari olarak temin edilen, istenilen antikorda, önerilen koşullarda muamele edilerek antikorların proteine bağlanması sağlandı. Primer antikorlarla muamelesinden sonra tekrar yıkılarak primerlere uygun sekonder antikorlar ile uygun oranda ve sürede muamele edildi.

Antikor olarak Cell Signaling Technology ve Santa Cruz Biotechnology'ye ait primer ve sekonder antikorlar kullanıldı. Kullanılan primer antikorlar: total RSK (CST, 8019, 1:1000), RSK2 (CST, 9347, 1:1000), p-RSK (Thr359/Ser363) (CST, 9341, 1:1000), Bcl-2 (CST, 3498, 1:1000), Bax (CST, 2772, 1:1000) ve yükleme kontrolü olarak β -actin (Santa Cruz, sc-47778, 1:5000)'dir. Primerlere karşılık sekonder antikor olarak anti-rabbit IgG (Santa Cruz, sc-2357, 1:5000) ve anti-mouse IgG (Santa Cruz, sc-2005, 1:5000) antikorları kullanıldı.

3.2.6.6 Problema

Uygun antikorlarla muamele edilen membran problema adımı için öncelikle yıkandı. Daha sonra Thermo Scientific markasına ait ECL solüsyonu eşit oranda karıştırılarak uygulandı ve UVP biospectrum sistemi yardımıyla görüntülemesi sağlandı. Alınan görüntüler Image J programı yardımıyla analiz edildi.

3.2.7 Flow Sitometre

HT-29 ve SW480 hücre hatlarında potansiyel inhibitörler uygulandıktan sonra apoptoza etkilerini gözlemlemek için Annexin V deneyi uygulandı. 6 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 500.000 hücre gelecek şekilde paylaştırıldı. Bir gece inkübasyon sonra, potansiyel inhibitörler IC₅₀ dozunda uygulandı ve kontrol grubu hücrelere inhibitörlerin içerisinde çözündüğü tek başına DMSO uygulandı. ve 72 saat boyunca beklendi. 72 saat sonunda PBS kullanılarak besiyeri yıkandı ve TE kullanılarak hücreler yüzeyden kaldırıldı. 15 mL'lik falkonlarda santrifüj ile çöktürme işleminden sonra 2 kez daha olacak şekilde pellet tekrar tekrar çözülüp santrifüj yaptırıldı. Annexin çözeltisi %1 BSA içeren PBS'te çözüldü ve örnek başına 100 mikrolitre olacak şekilde paylaştırıldı. 20 dk boyunca karanlık ortamda bekletildikten sonra Guava EasyCyte™ flow sitometre cihazında analizler yapıldı.

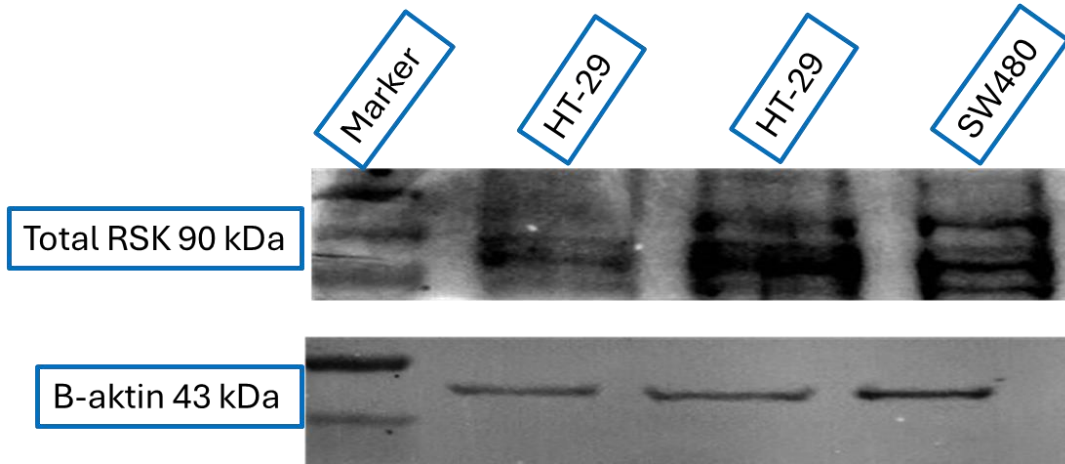
3.3 İstatistiksel analiz

Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verilmiştir. Verilerin analizinde GraphPad Prism (sürüm 10.1.0) programı kullanılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalar için İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) uygulanmış olup, $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 RSK1 ve RSK2 Proteinlerinin Hücre İçi Seviyelerinin Belirlenmesi

Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde SW480 ve HT-29 hücreleri büyütüldükten sonra hücrelerden Bölüm 3.2.6’da anlatıldığı şekilde RIPA protokolü ile protein elde işlemi gerçekleştirildi. SW480 ve HT-29 hücrelerine hiçbir uygulama yapılmadan total RSK seviyesi spesifik antikor kullanılarak belirlendi. 40 µg olacak şekilde SDS-PAGE jeline protein lizatları eklendi ve jel elektroforezi sağlandı. PVDF membrana 1 gece boyunca transfer işlemi yapıldı. Sonrasında membran 90 dk boyunca yağsız süt tozu kullanılarak bloklandı ve gece boyunca total RSK 1/1000 antikoruyla; 90 dk boyunca β-Aktin antikoruyla muamele edildi. Sonrasında 90 dk boyunca Anti-Rabbit sekonder antikoruyla muamele edildikten sonra ECL solüsyonu kullanılarak görüntülendi. Yapılan çalışmada Şekil 4.1’de verildiği üzere SW480 ve HT29 hücrelerinde RSK proteininin varlığı kanıtlanmıştır.



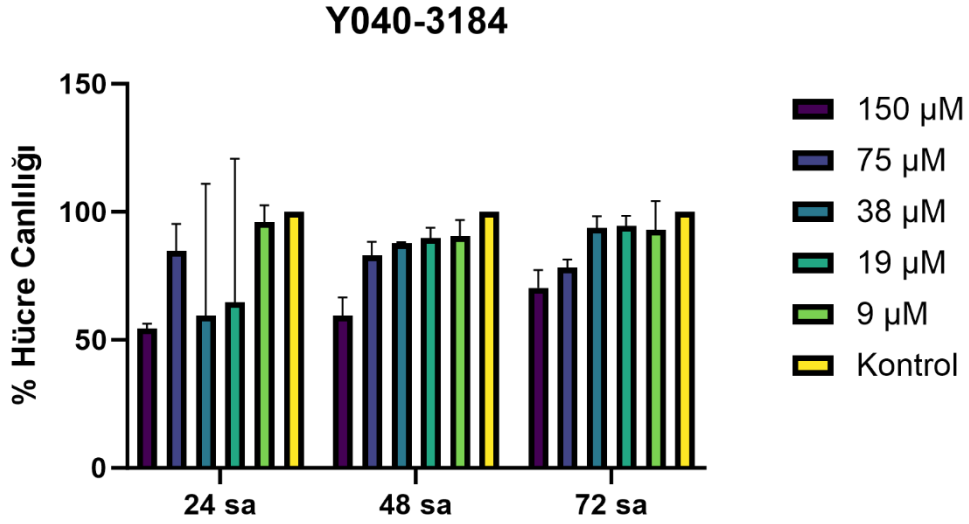
Şekil 4.1: Hücrelerde bulunan RSK geninin Western Blot görüntüsü

4.2 Seçilen İnhibitör Adaylarının Hücresel Analizlerinin MTT Sitotoksitesitesi

İnhibitör adaylarının seçilen hücreler üzerindeki sitotoksitesitesinin belirlenmesi için MTT testi Bölüm 3.2.3’de anlatıldığı şekilde uygulandı. Belirlenen 11 potansiyel inhibitörün 5 farklı konsantrasyonda (150 µM, 75 µM, 38 µM, 19 µM ve 9 µM) SW480, HT-29 ve HUVEC hücrelerine uygulandı. Kontrol olarak 2 µL DMSO uygulanmış gruplar kullanılmıştır. Üç farklı zaman diliminde 24, 48 ve 72 saatlerde MTT testi uygulanmış ve MTT testi Bölüm 3.2.3’te belirtildiği üzere gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin IC₅₀ dozları hesaplanabilecek olanlar web bazlı AATBioquest (<https://www.aatbio.com/>) programı yardımıyla hesaplanmıştır.

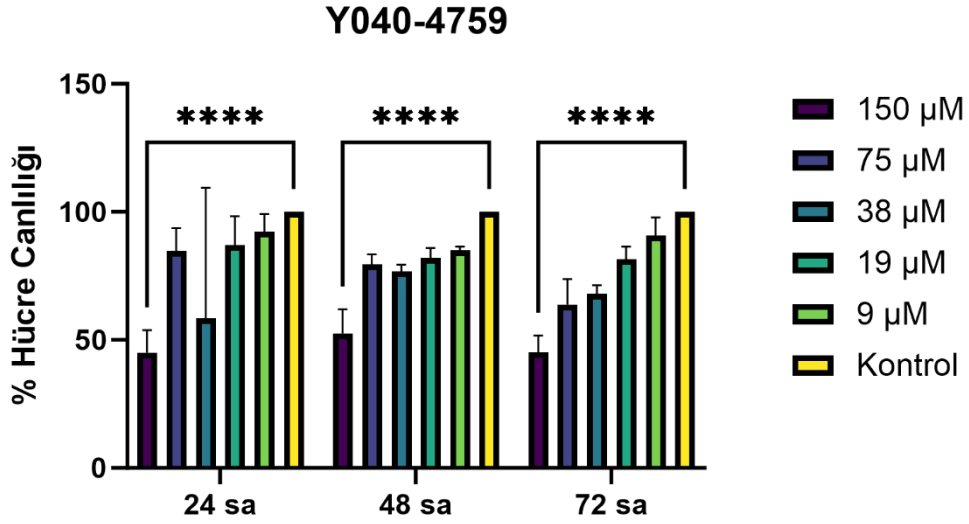
4.2.1 Potansiyel inhibitörlerin HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi

HT-29 hücre hattı çalışmalarında Y040-3184 bileşiğinin bütün saat dilimlerinde özellikle en yüksek doz olan 150 μ M uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde toksik etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



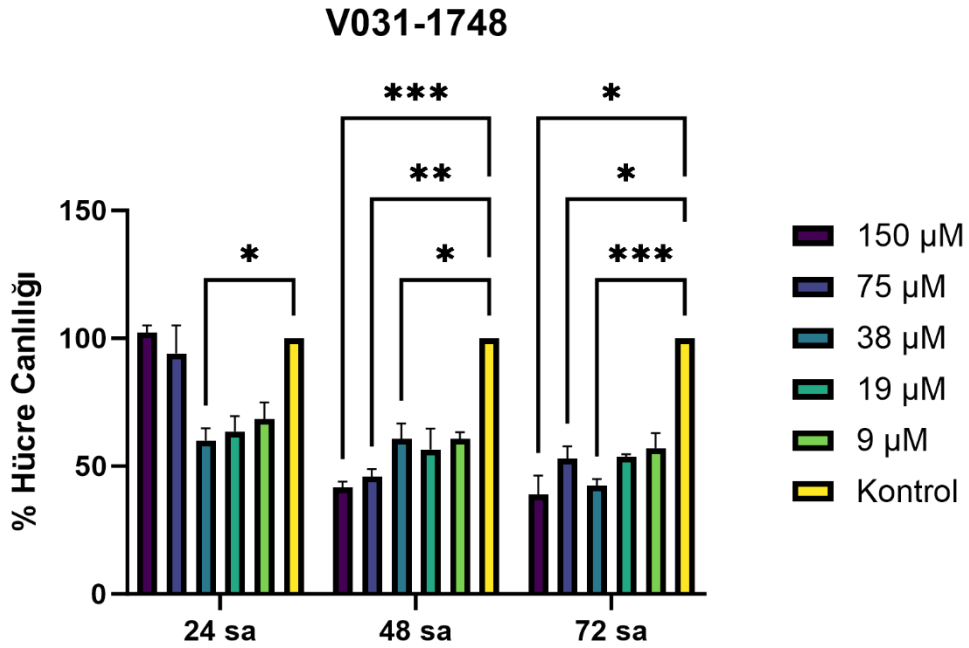
Şekil 4.2: Y040-4759 İnhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

HT-29 hücre hattı çalışmalarında, Y040-4759 bileşiğinin bütün saat dilimlerinde özellikle en yüksek doz olan 150 μ M uygulamalarda istatistiki olarak anlamlı şekilde toksik etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



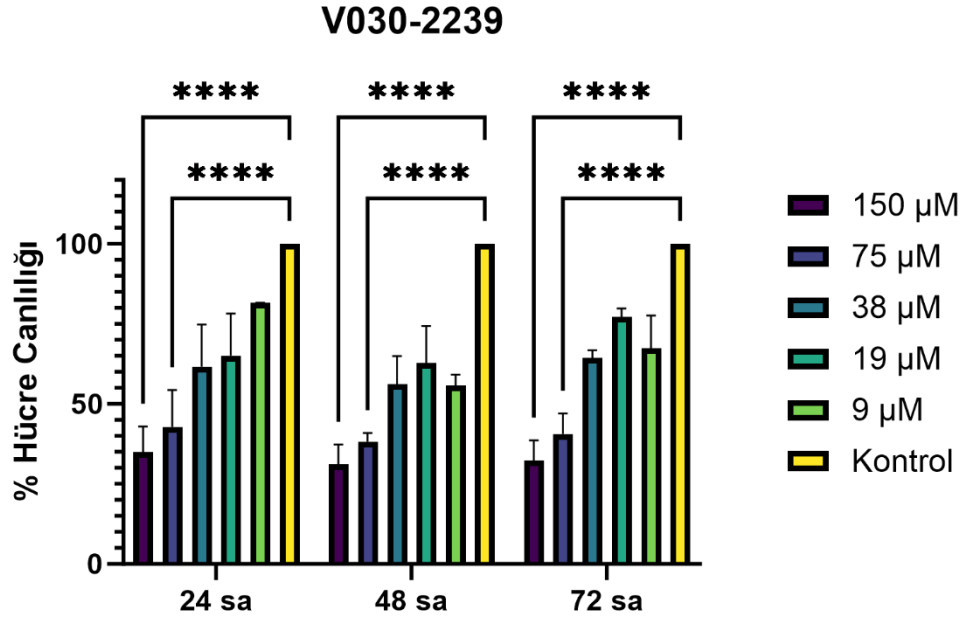
Şekil 4.3: Y040-4759 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

V031-1748 aday inhibitörünün HT-29 hücrelerinde doza göre 48 ve 72 saatlerde etkili olduğu MTT testi sonucuna göre belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: V031-1748 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

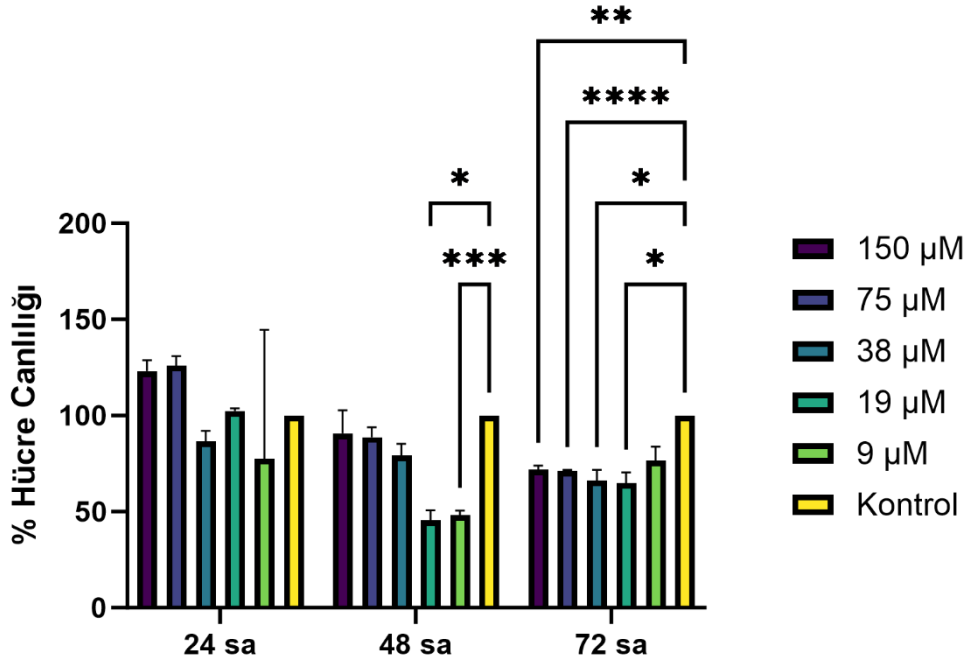
V030-2239 aday inhibitörünün yapılan MTT testi sonucunda tüm saat aralıklarında kontrol grubuna kıyasla %50'nin üzerinde ölüme yol açtığı belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: V030-2239 inhibitör Adayı HT-29 MTT grafiği

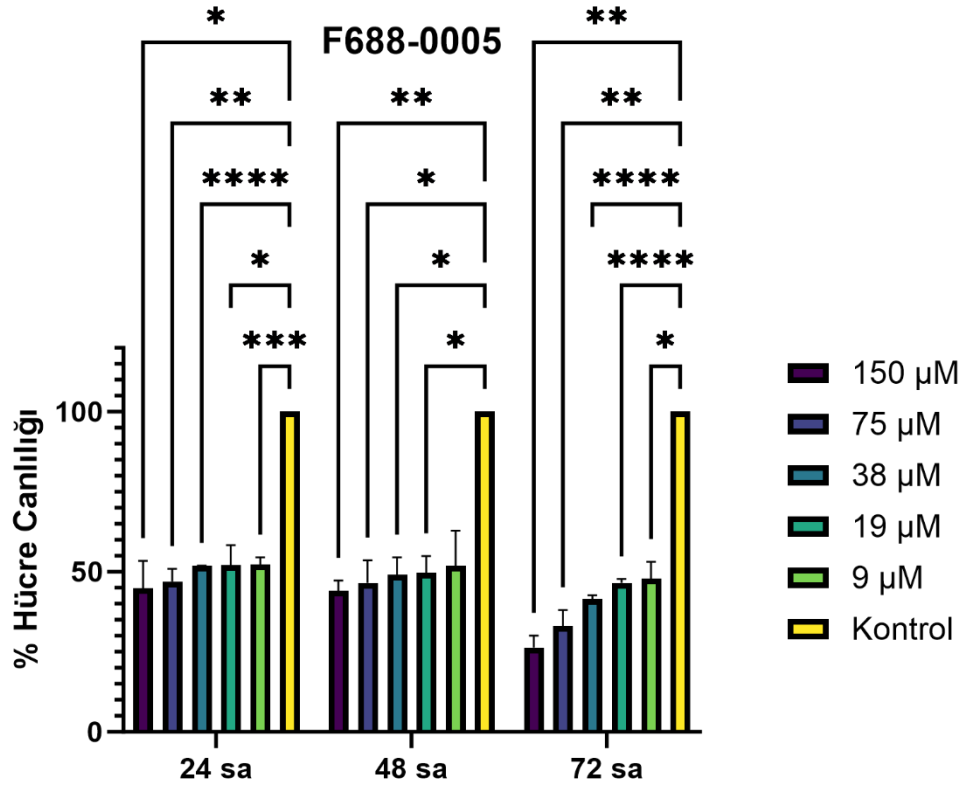
Yapılan MTT testi sonucunda S322-0083 kodlu aday inhibitörünün hücre canlılığına etkisi bulunsa da öldürme oranının %50'nin altında olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).

S322-0083



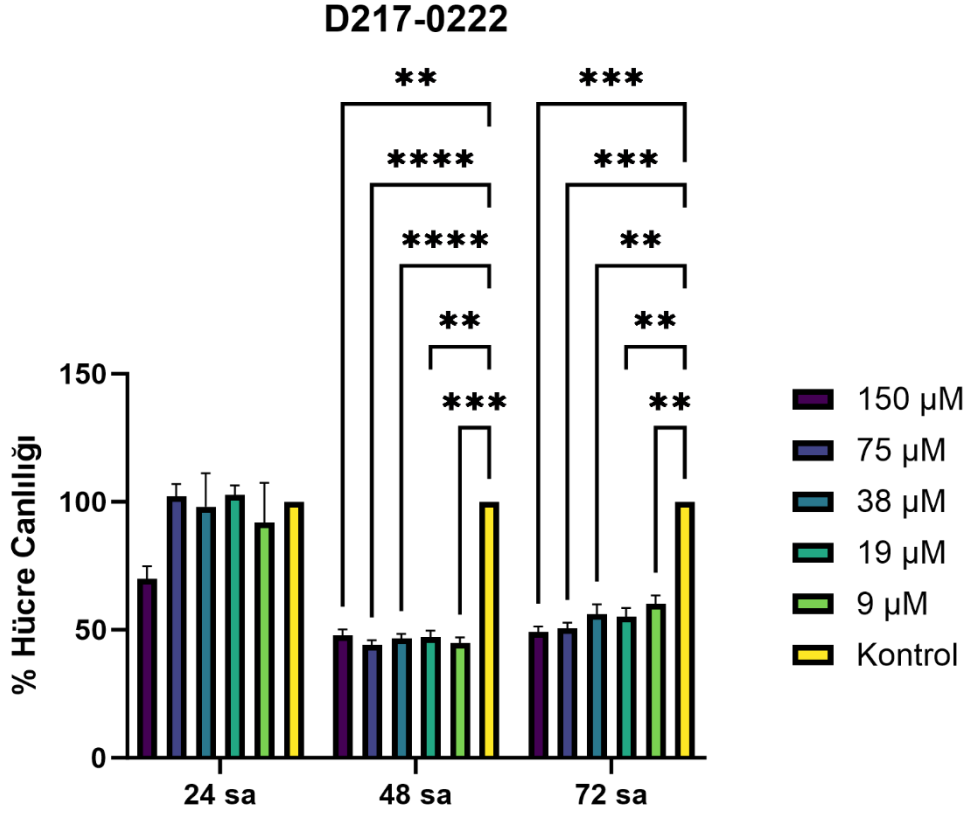
Şekil 4.6: S322-0083 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

F688-0005 aday inhibitörünün hücrelere her dozda toksik etki uyguladığı ve bu etkinin 72. Saatte maksimuma ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: F688-0005 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

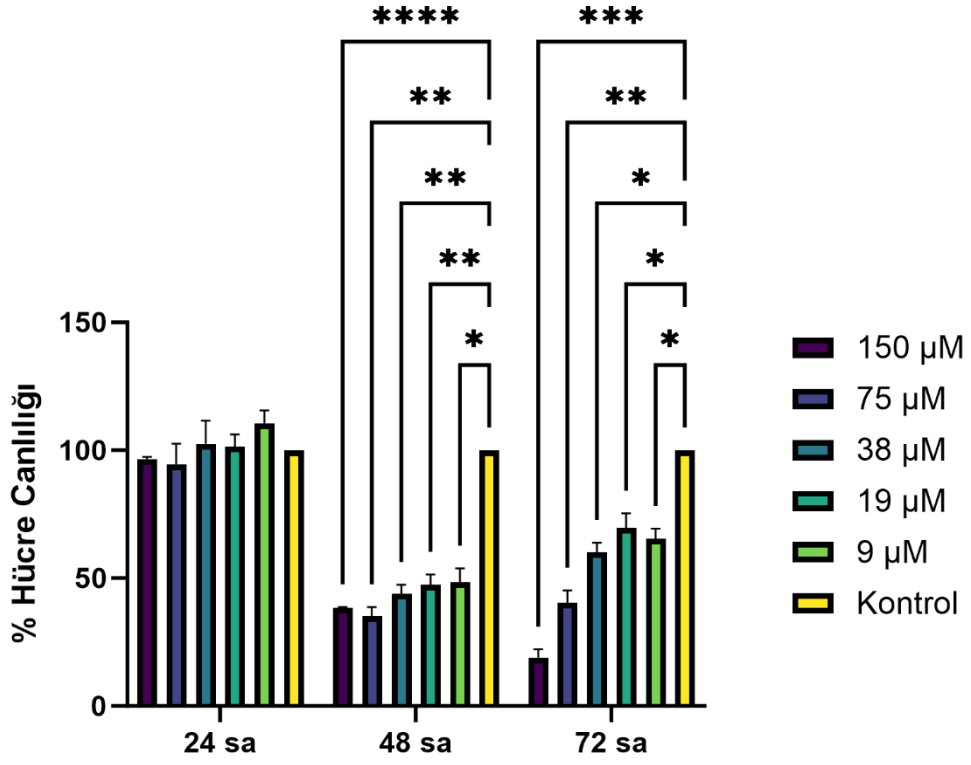
D217-0222 bileşiğinde ise, 24 saatte en yüksek dozda gözlemlenen hücre toksisitesi 48. ve 72. saatlerde giderek artmış ve özellikle 48 ve 72 saatlerde bütün dozlarda ciddi toksisite etkili olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: D217-0222 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

C592-3214 bileşiği 48 ve 72 saatlerde bütün dozlarda toksik etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

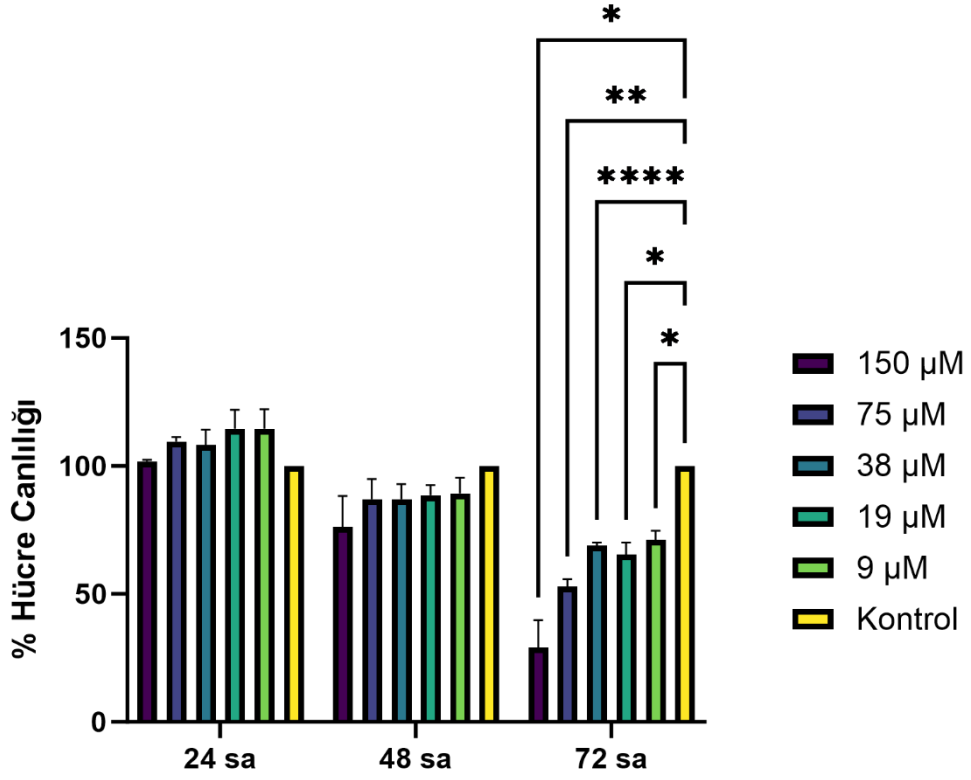
C592-3214



Şekil 4.9: C592-3214 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

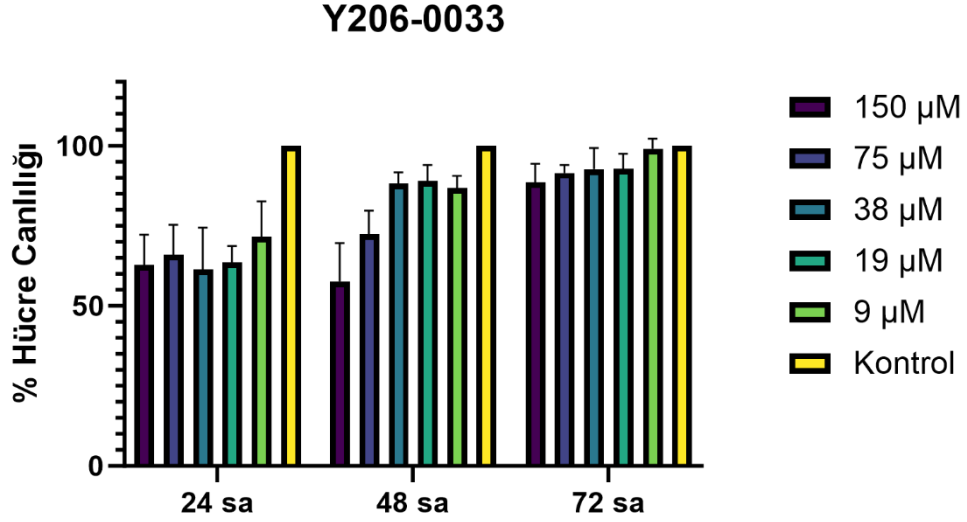
6190-0389 bileşiği 72. Saat ve en yüksek dozda hücre canlılığını %50'nin altına düşürmüştür (Şekil 4.10).

6190-0389



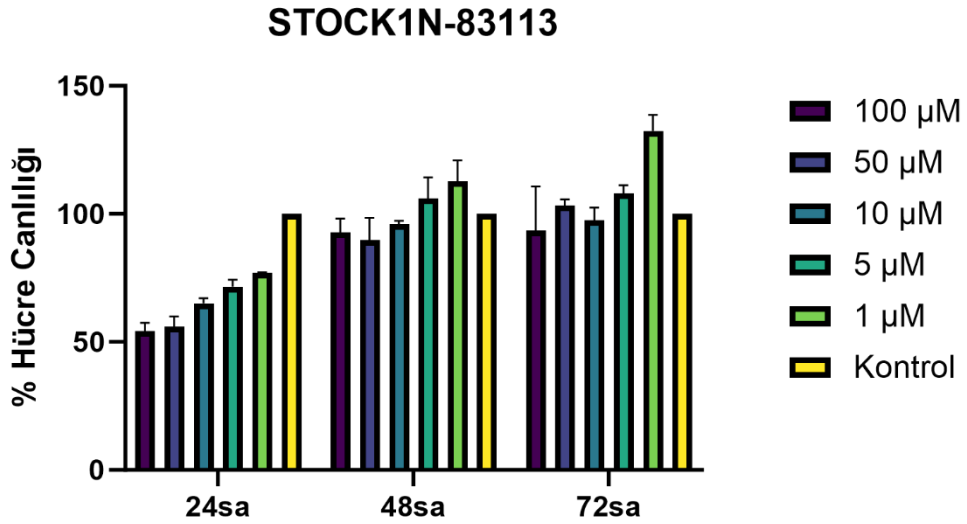
Şekil 4.10: 6190-0389 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

Y206-0033 bileşiği yapılan MTT testi sonucunda HT-29 hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermemiştir. (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Y206-0033 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

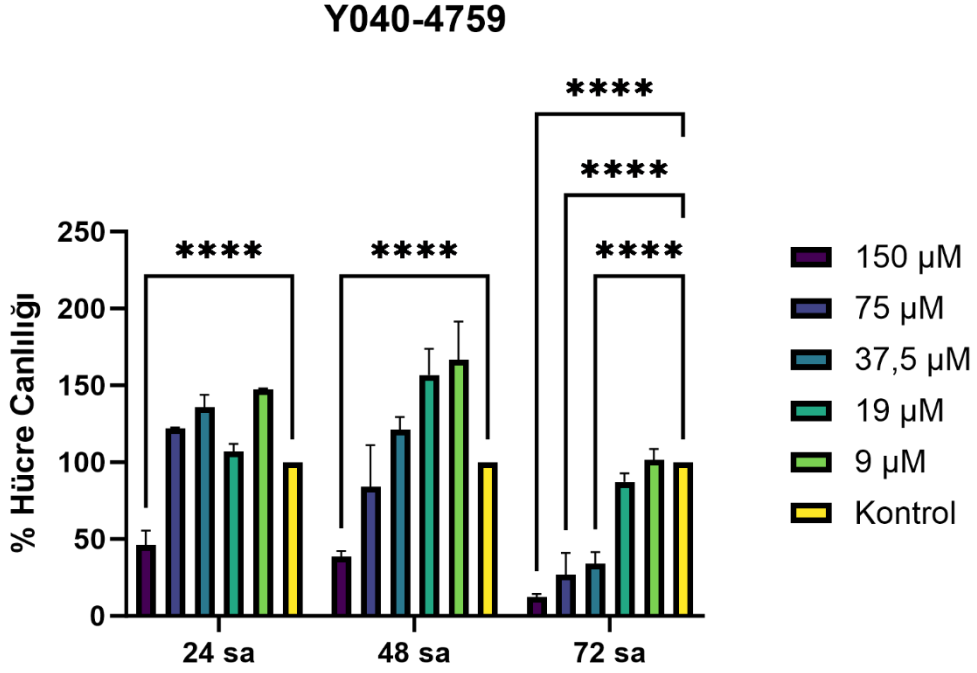
STOCK1N-83113 bileşiği de yapılan MTT testi sonucunda herhangi bir toksik etki göstermemiştir(Şekil 4.12).



Şekil 4.12: STOCK1N-83113 inhibitör adayı HT-29 MTT grafiği

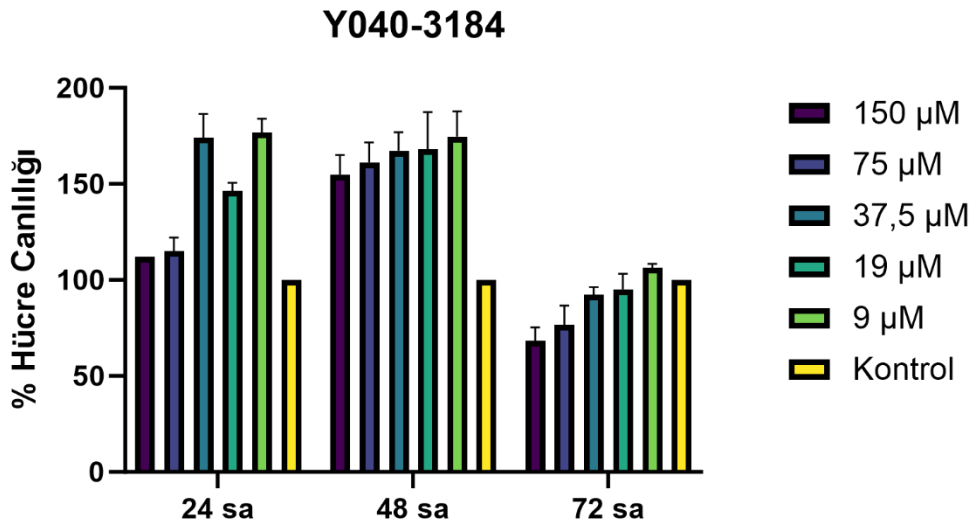
4.2.2 Potansiyel inhibitörlerin SW480 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi

Y040-4759 grafiği analiz edildiğinde doza ve zamana bağlı olarak SW480 hücrelerinde toksik etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



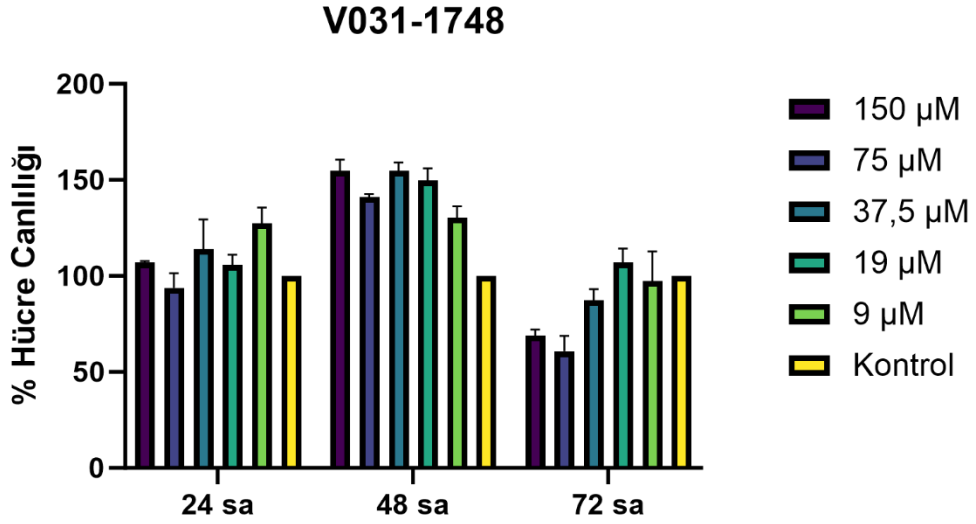
Şekil 4.13: Y040-4759 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

Y040-3184 adlı potansiyel inhibitör 24. Ve 48. Saatlerde toksik etki gösterirken, 72. Saatte bu etkiyi kaybetmiştir (Şekil 4.14).



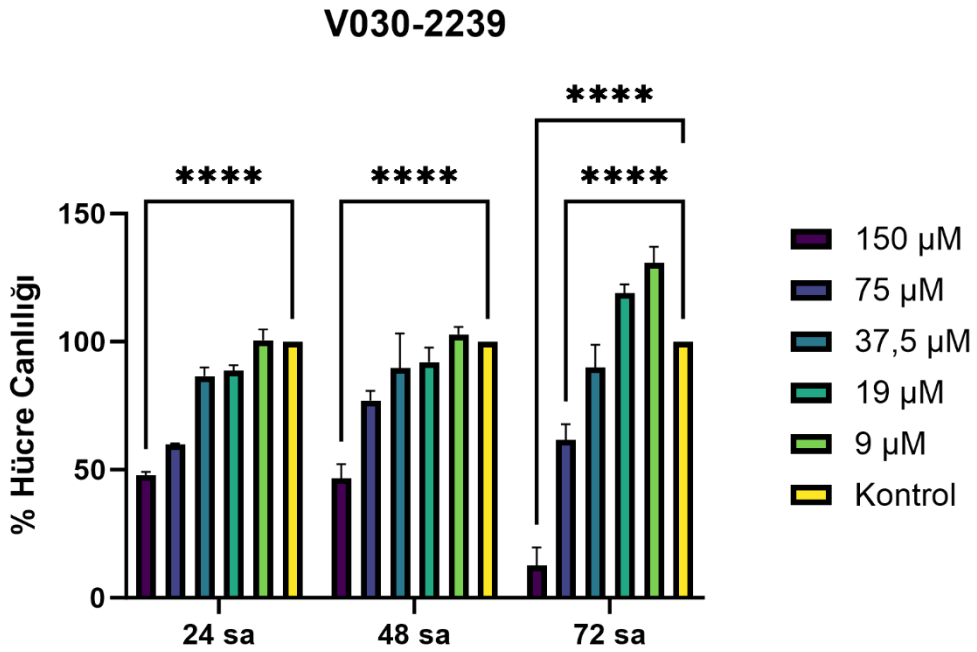
Şekil 4.14: Y040-3184 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

V031-1748 aday inhibitörünün toksik etkili olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



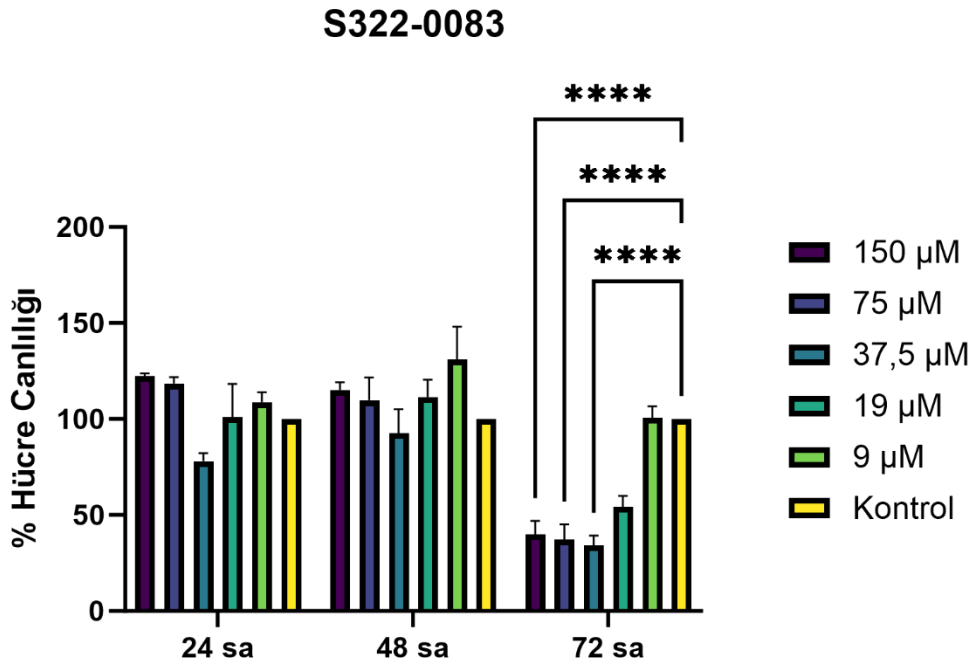
Şekil 4.15: V031-1748 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

V030-2239 bileşiği özellikle 150µM dozda bütün saatlerde %50'nin altında bir toksisite etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak 72 saatte en küçük dozlarda kontrole kıyasla bir proliferasyon görüldüğü için IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır (Şekil 4.16).



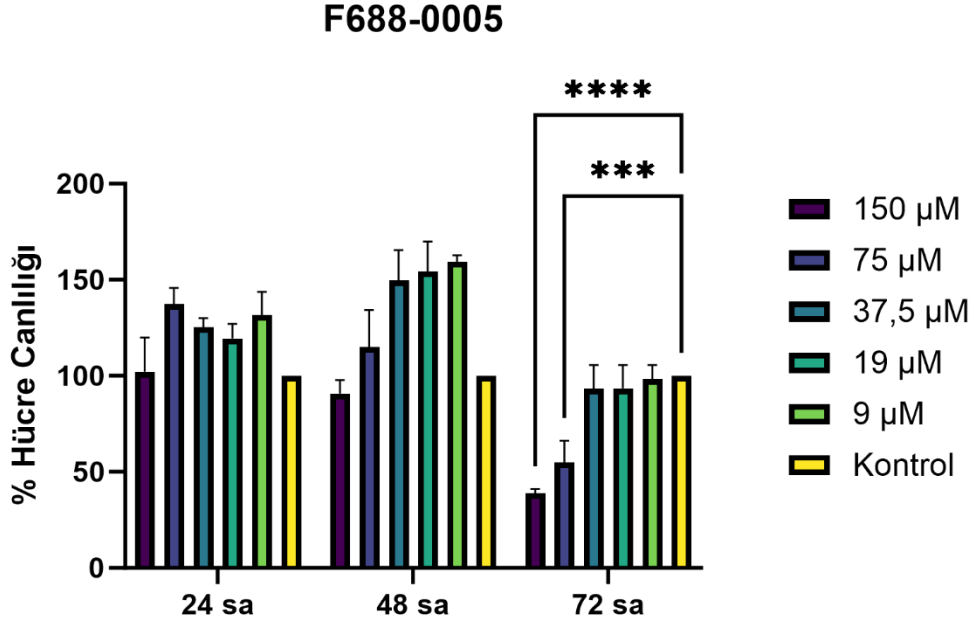
Şekil 4.16: V030-2239 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

S322-0083 aday inhibitörü 24 ve 48 saatte toksik etki göstermezken, 72 saatte toksik etkili olduğu ve hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



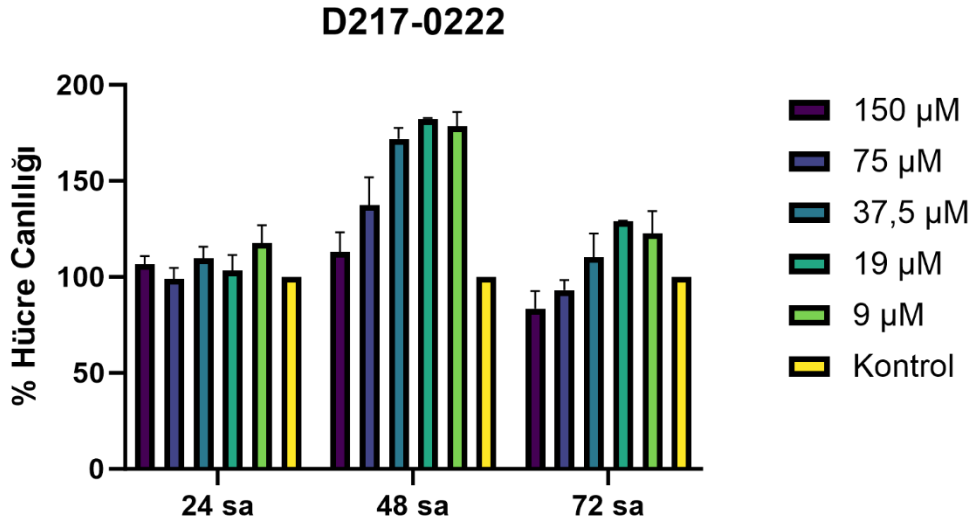
Şekil 4.17: S322-0083 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

F688-0005 aday inhibitörünün 72 saat zaman diliminde en yüksek dozda toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



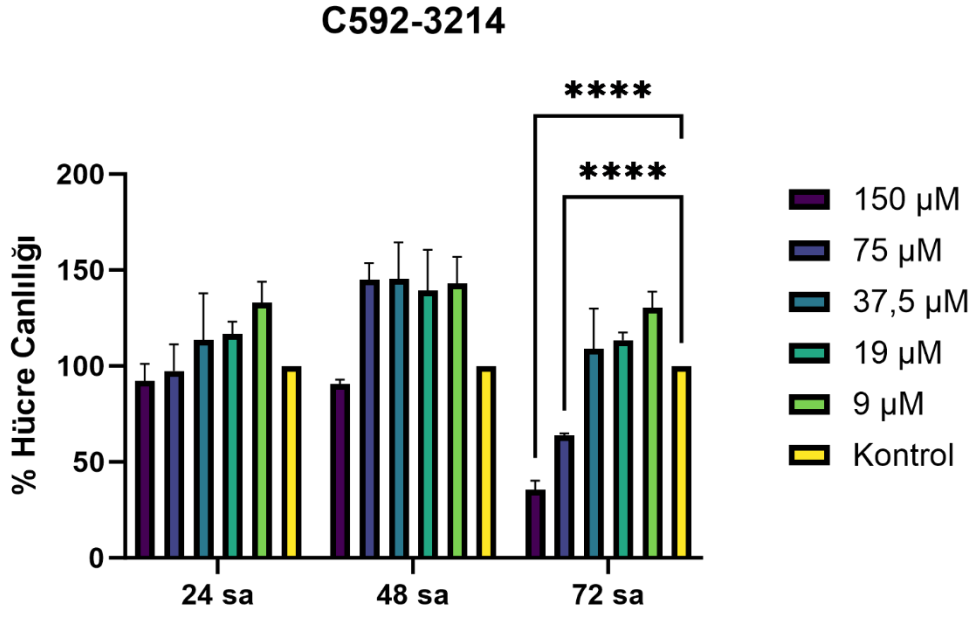
Şekil 4.18: F688-0005 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

D217-0222 bileşiği SW480 hücre hattında toksik etki göstermemiştir (Şekil 4.19).



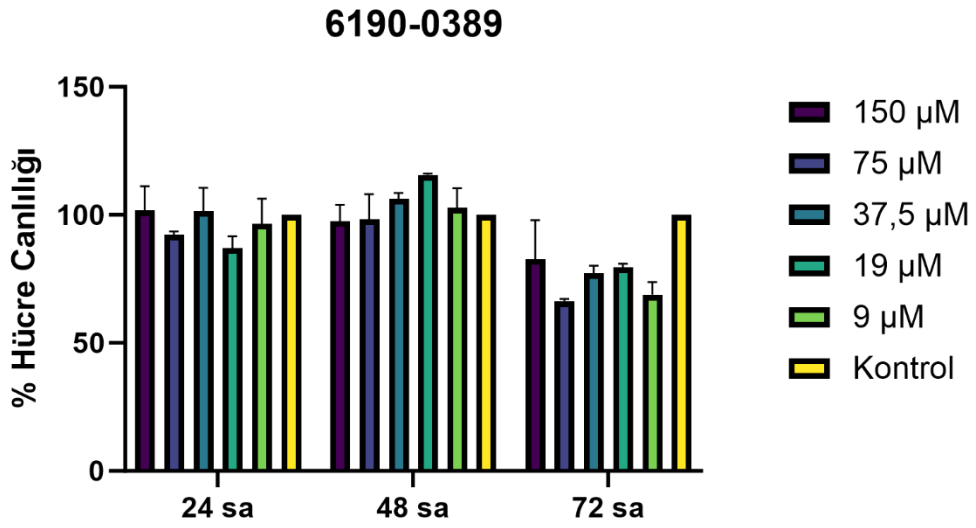
Şekil 4.19: D217-0222 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

C592-3214 bileşiği 72 saatte en yüksek dozda toksik etki göstermiştir (Şekil 4.20).



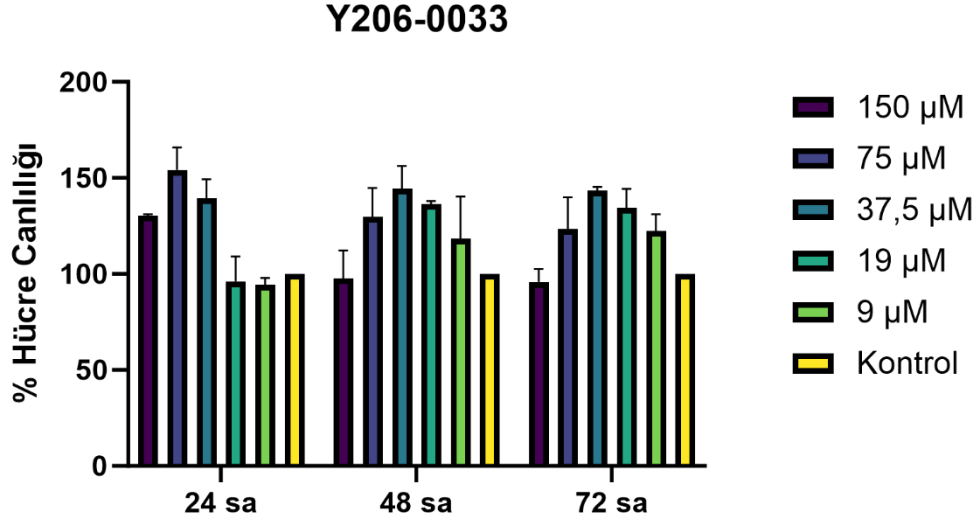
Şekil 4.20: C592-3214 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

6190-0389 bileşiği SW480 hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermemiştir(Şekil 4.21).



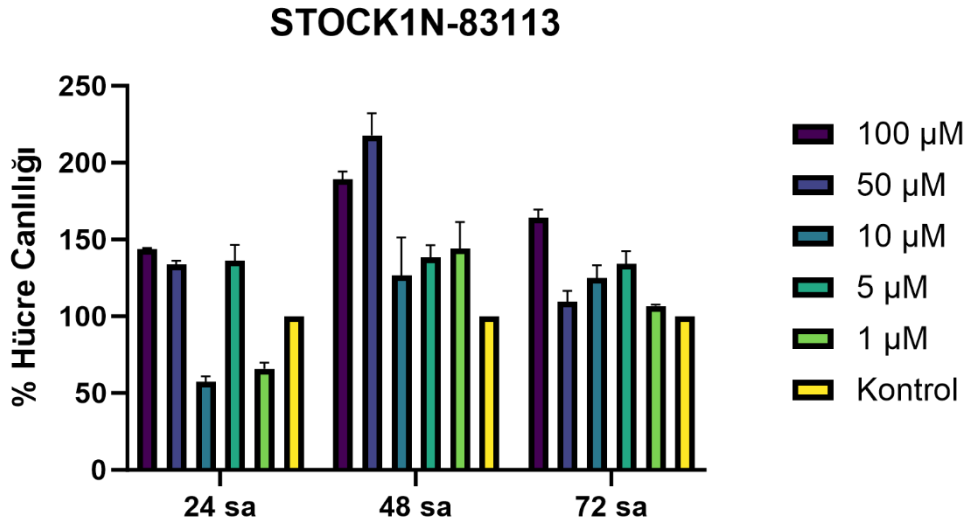
Şekil 4.21: 6190-0389 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

Y206-0033 bileşiği toksik bir etki göstermemiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: Y206-0033 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

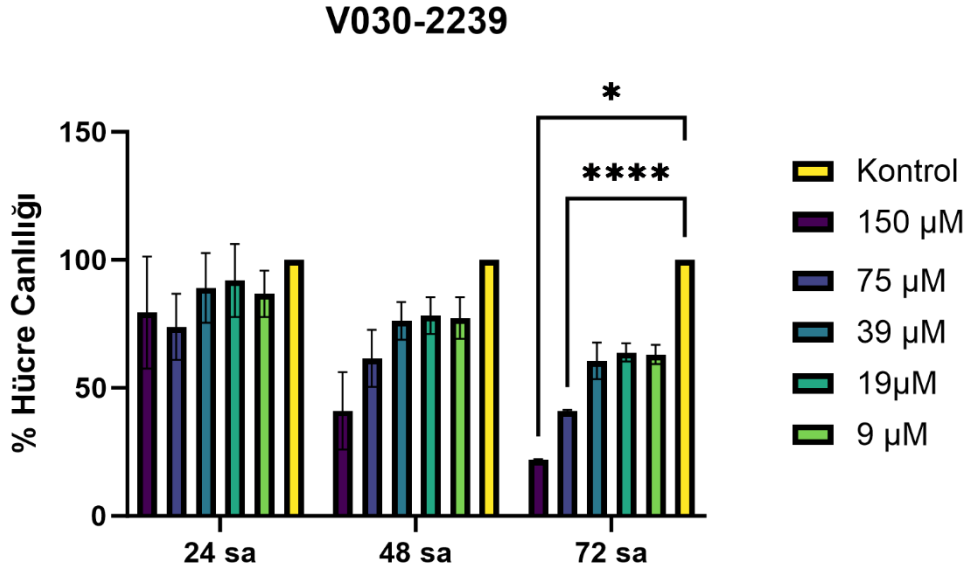
STOCK1N-83113 bileşiği toksik bir etki göstermemiştir (Şekil 4.23).



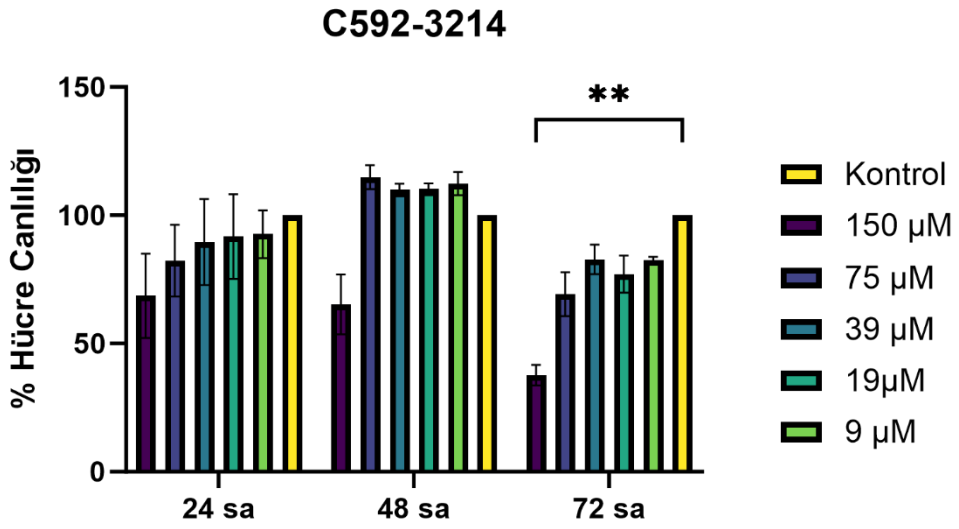
Şekil 4.23: STOCK1N-83113 inhibitör adayı SW480 MTT grafiği

4.2.3 Potansiyel inhibitörlerin sağlıklı model HUVEC üzerindeki sitotoksik aktivitesi

Sağlıklı model olan insan göbek kordon bağı hücreleri (HUVEC) kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda sitotoksik aktivite analizleri yapılmıştır. Y040-4759 (Şekil 4.26), V030-2239 (Şekil 4.24) ve C592-3214 (Şekil 4.25) potansiyel inhibitörleri sağlıklı hücre grubu için özellikle 72 saatlerde hücre yoğunluğunu %50'nin altına düşürecek oranda toksisite gözlemlenmiştir.

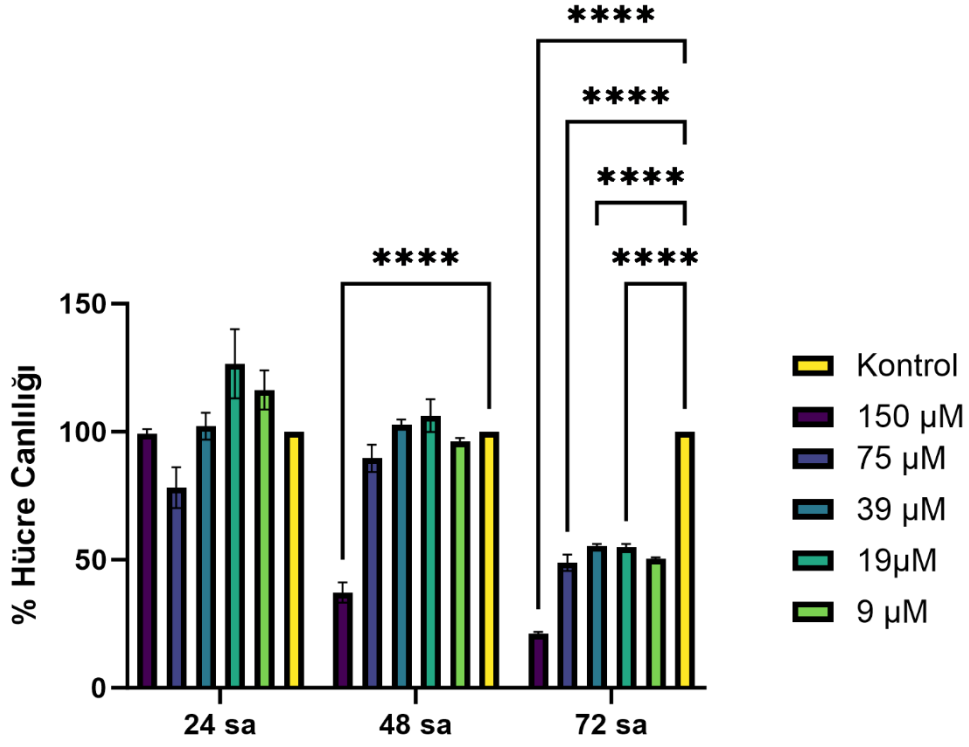


Şekil 4.24: V030-2239 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği



Şekil 4.25: C592-3214 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

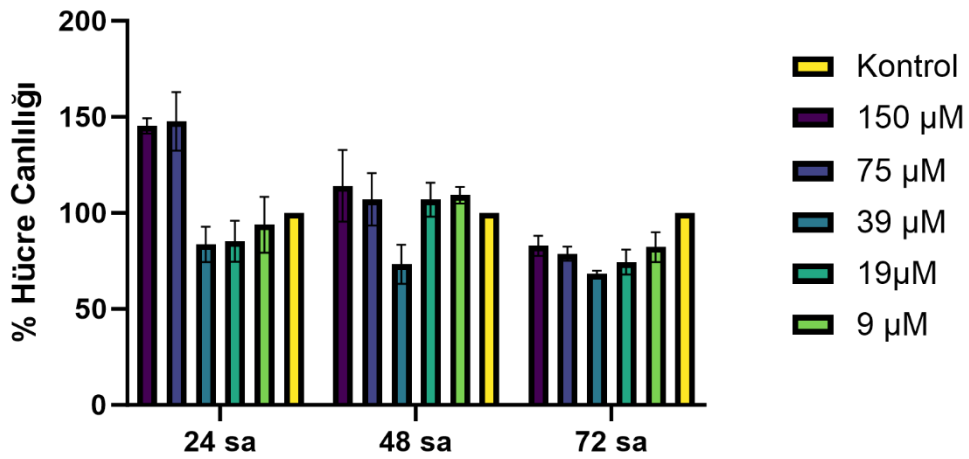
Y040-4759



Şekil 4.26: Y040-4759 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

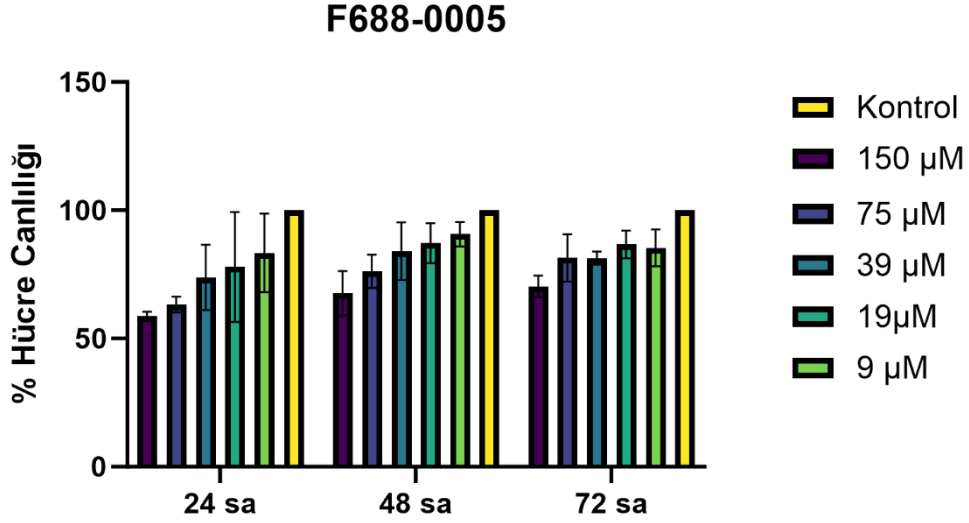
S322-0083 bileşiği HUVEC hücrelerinde toksisite göstermemiştir (Şekil 4.27).

S322-0083



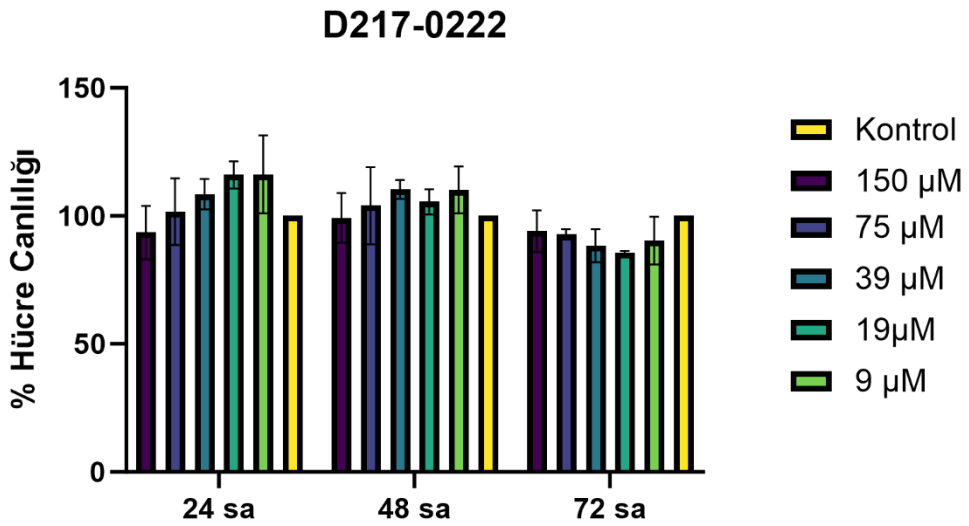
Şekil 4.27: S322-0083 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

F688-0005 inhibitörü sağlıklı model HUVEC hücrelerinde çok düşük oranda toksisite göstermiştir (Şekil 4.28).



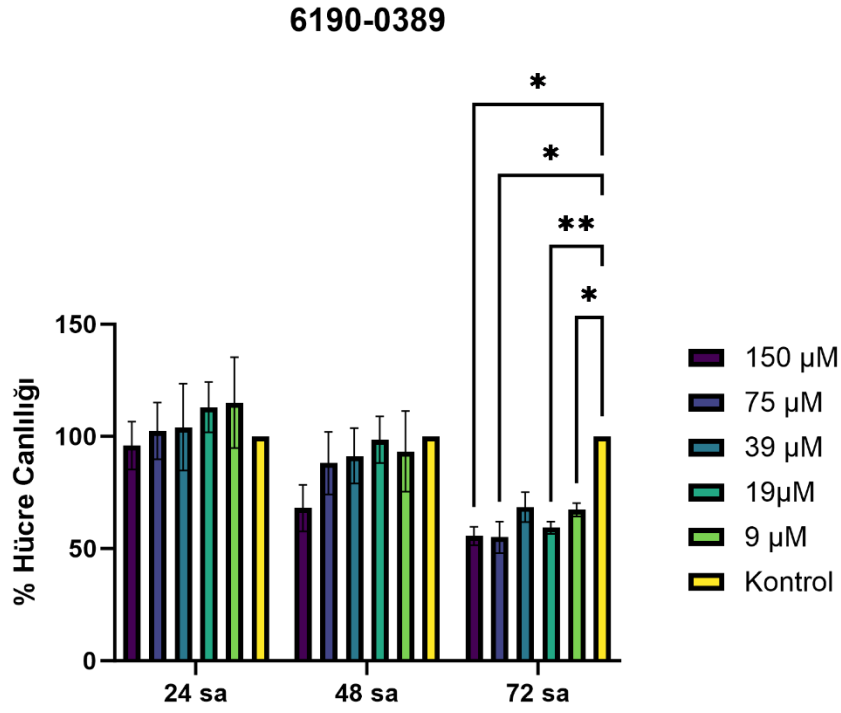
Şekil 4.28: F688-0005 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

D217-0222 bileşiği HUVEC hücre hattında toksik bir etki göstermemiştir (Şekil 4.29).



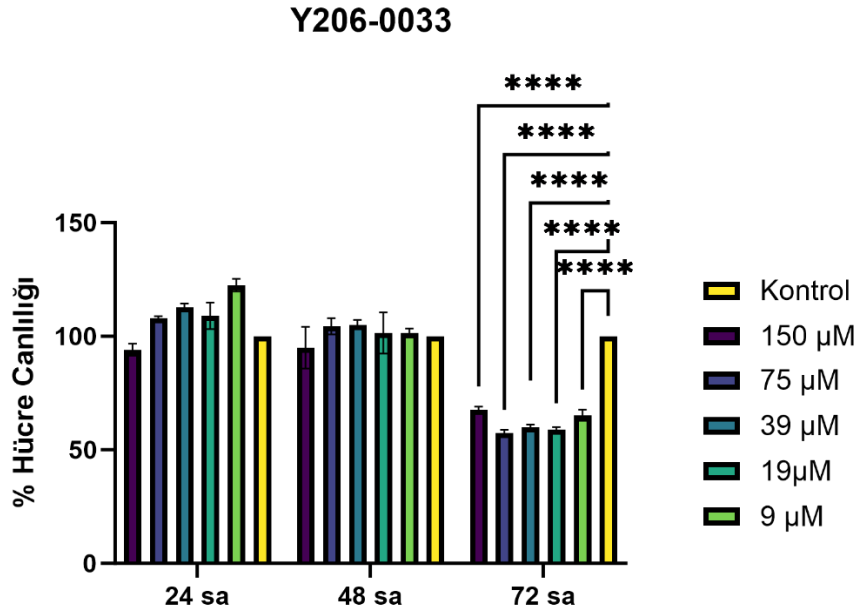
Şekil 4.29: D217-0222 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

6190-0389 bileşiği 72. saatte toksik etki gösterse de hücre konsantrasyonu %50'nin altına düşmemiştir (Şekil 4.30).



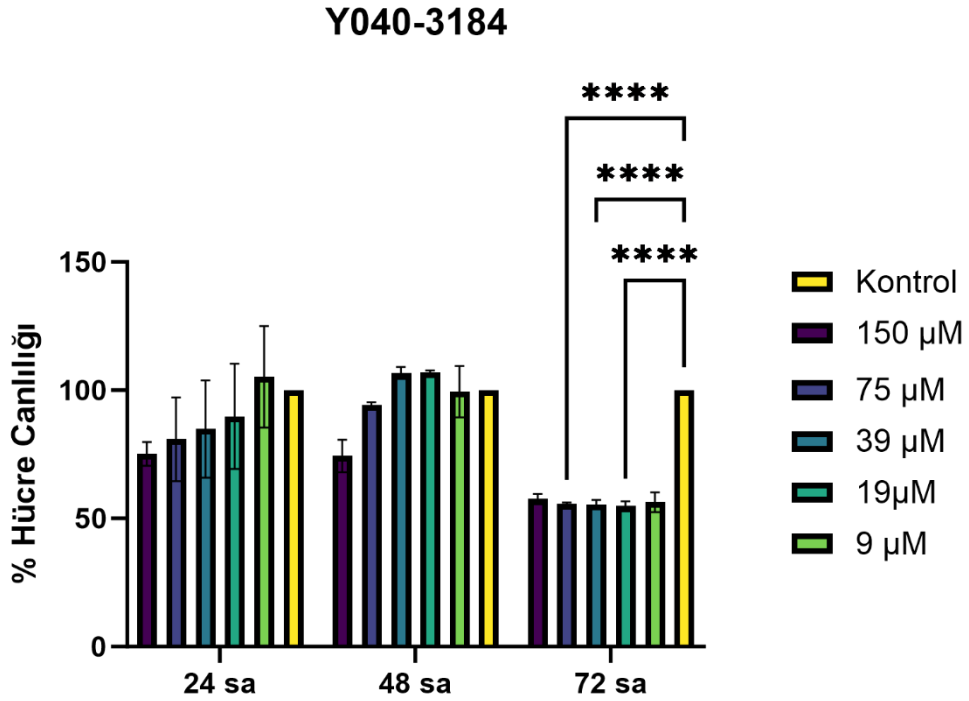
Şekil 4.30: 6190-0389 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

Y206-0033 bileşiği 72. saatte toksik etki gösterse de hücre öldürme düzeyi %50'nin altındadır (Şekil 4.31).



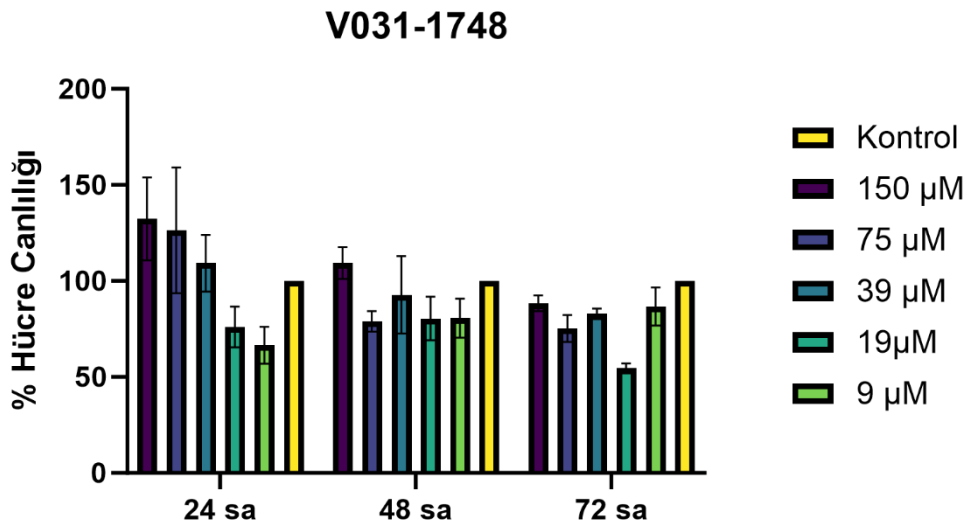
Şekil 4.31: Y206-0033 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

Y040-3184 aday inhibitörü 72 saatte tüm dozlarda toksik etki göstermiştir fakat bu etki %50'nin altında kalmıştır (Şekil 4.32).



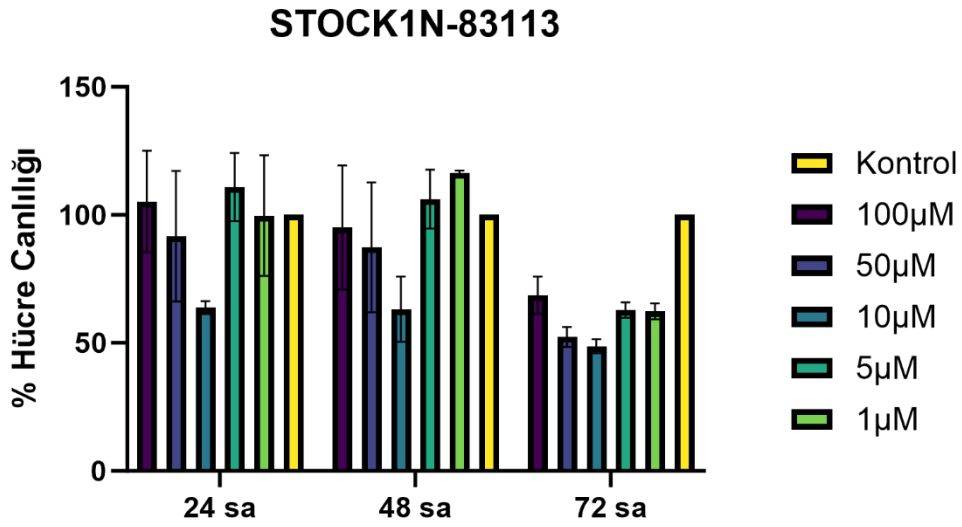
Şekil 4.32: Y040-3184 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

V031-1748 bileşiği HUVEC hücre hattında toksik bir etki göstermiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: V031-1748 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

STOCK1N-83113 Bileşiği toksik etki göstermemiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34: STOCK1N-83113 inhibitör adayı HUVEC MTT grafiği

4.2.4 Potansiyel inhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması

Genel olarak sitotoksik aktivite bulguları değerlendirildiğinde toksik inhibitörler için IC₅₀ dozları belirlenmiştir. IC₅₀ hesaplamaları 72 saate göre yapılmıştır. HT-29 hücreleri için en düşük %50 toksisite değerini V031-1748 adlı bileşiğin gösterdiği görülmüştür (Tablo 4.1)

Tablo 4.1: HT-29 Hücreleri IC₅₀ değerleri

Bileşik Adı	IC ₅₀ (µM)
F688-0005	61.0863
Y040-3184	69.3212
C592-3284	75.5523
6190-0389	78.3787
V030-2239	54.1355
V031-1748	31.6696

SW480 hücre hattında elde edilen IC₅₀ değerleri gösterilmiştir. Hesaplamalar 72 saate göre yapılmıştır. En yüksek toksisiteyi gösteren ve en düşük %50 inhibisyon konsantrasyonuna sahip bileşik, S322-0083 olarak belirlenmiş ve aday inhibitör olarak tanımlanmıştır. Aynı bileşiğin HT-29 hücre hattında toksik etki göstermediği tespit edilmiştir. IC₅₀ değerleri

belirlenen bileşikler, ileri düzeyde hücre ölüm mekanizması testlerine tabi tutulmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: SW480 Hücreleri IC₅₀ değerleri

Bileşik Adı	IC ₅₀ (µM)
F688-0005	63.614
Y040-4759	26.532
C592-3284	64.0268
S322-0083	17.7037

V030-2239, Y040-4759 ve C592-3214 bileşikleri, sağlıklı hücre hattı olan HUVEC üzerinde toksik etki göstermiştir. Hesaplamalar 72 saate göre yapılmıştır. Bu potansiyel inhibitörlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 91.06 µM, 74.31 µM ve 81.99 µM olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).

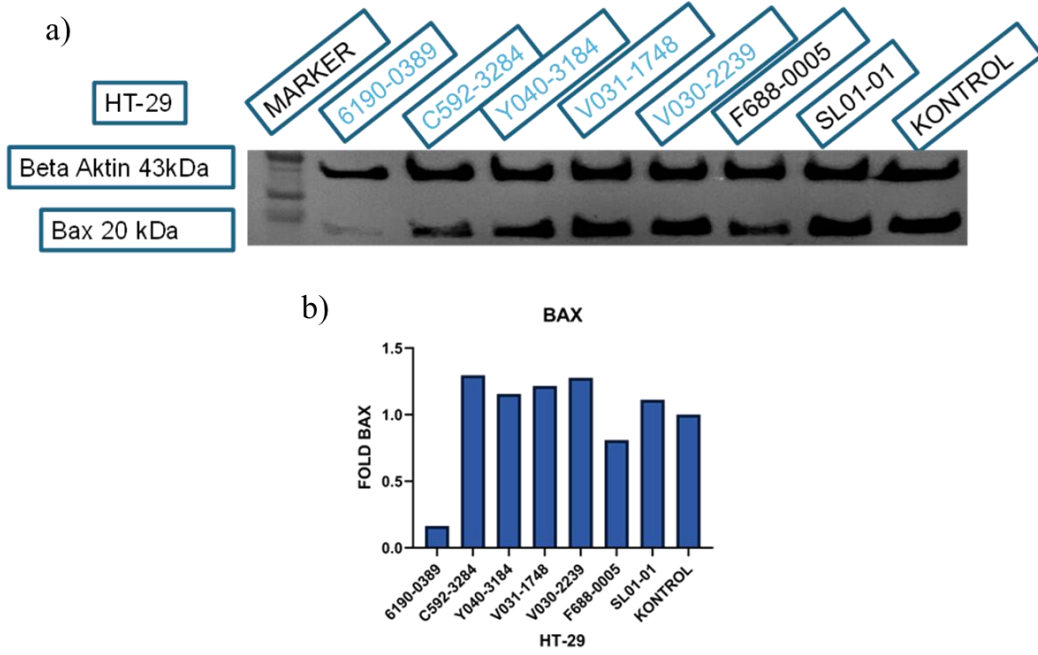
Tablo 4.3: HUVEC Hücreleri IC₅₀ değerleri

Bileşik Adı	IC ₅₀ (µM)
V030-2239	91.06
Y040-4759	74.31
C592-3284	81.99

4.3 Toksik Olduğu Belirlenen Potansiyel İnhibitörlerin Gösterdiği Proliferatif ve Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi

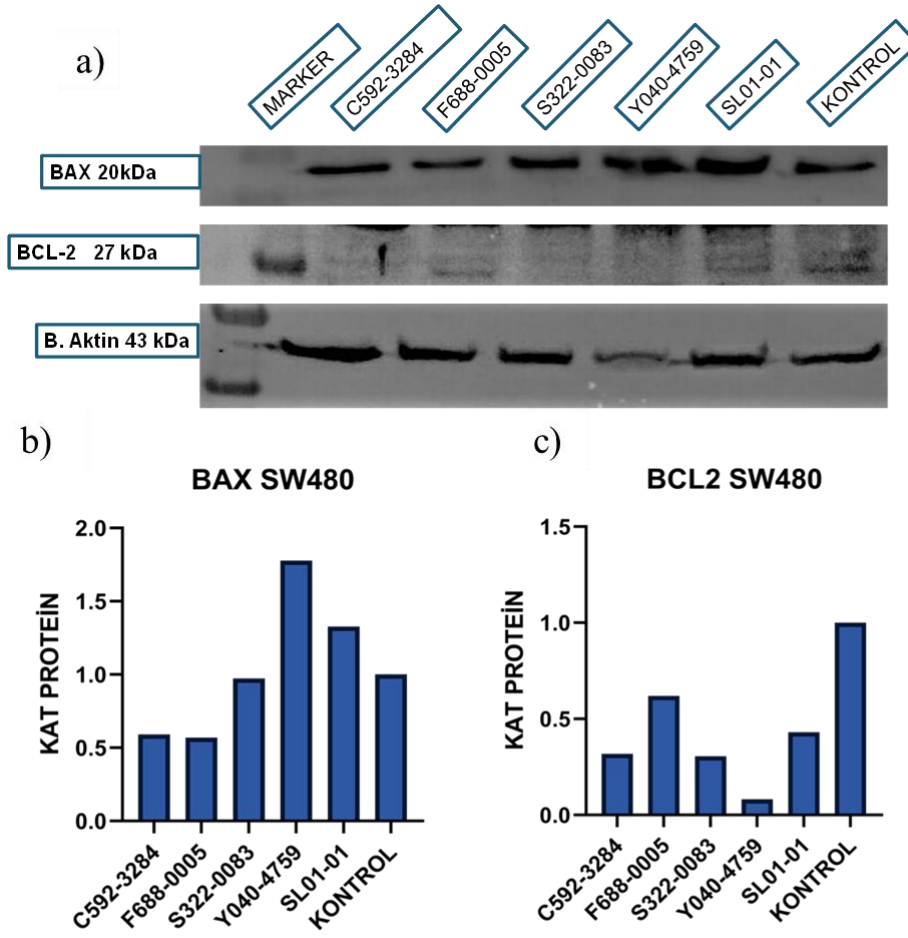
HT-29 hücre hattı için toksik olduğu belirlenen 6 inhibitör ile SW480 hücre hattı için belirlenen 4 inhibitöre ait detaylı apoptotik veriler, flow sitometri ve western blotting yöntemleri kullanılarak analiz edildi. Western blotting Bölüm 3.2.6.4'teki protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara dağıtıldıktan sonra, daha önce tanımlanan IC₅₀ dozlarında inhibitör uygulaması yapıldı. Uygulamanın ardından 72 saat geçince, hücreler RIPA tamponu ile kazınarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Apoptoz değerlendirmesi için BAX ve BCL-2 antikorları kullanıldı; β-aktin ise yükleme kontrolü ve normalizasyon amacıyla dahil edildi. HT-29 hücre hattında toksik etki gösteren 6 bileşiğe ait BAX protein düzeyleri, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sunuldu. Elde edilen

bulgulara göre, özellikle C592-3284, Y040-3184, V031-1748 ve V030-2239 numaralı bileşiklerin uygulandığı gruplarda BAX seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmektedir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35: a) HT-29 hücreleri BAX ve beta actin antikor görüntüsü b) BAX grafiği

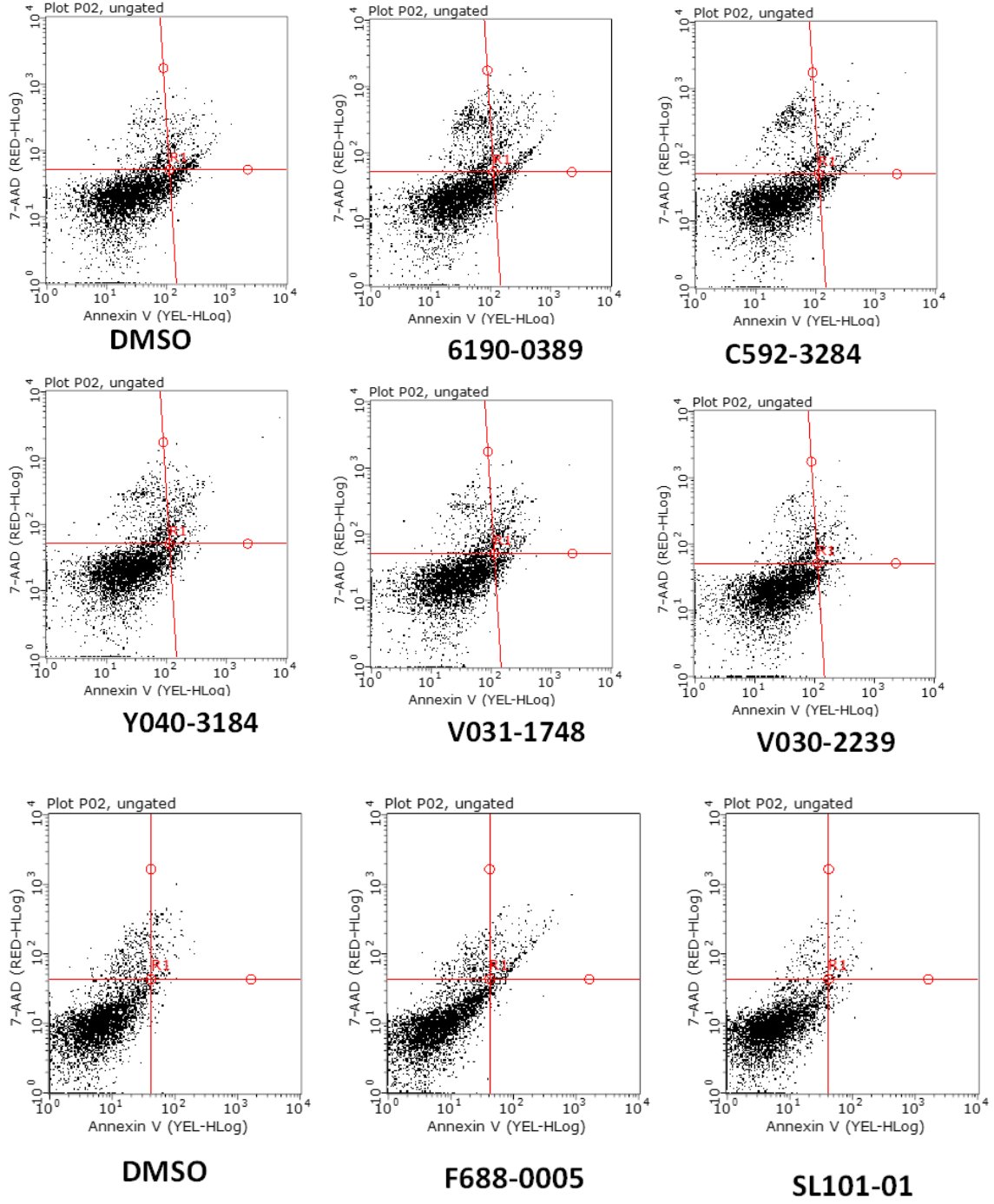
SW480 hücre hattı için belirlenen 4 inhibitöre yönelik olarak BAX ve BCL-2 antikor düzeyleri analiz edildi. Bax protein düzeyinin S322-0083, Y040-4759 ve SL01-01 bileşiklerinin uygulandığı gruplarda arttığı; buna karşılık BCL-2 düzeyinin ise protein seviyesinde azaldığı belirlendi (Şekil 4.36).



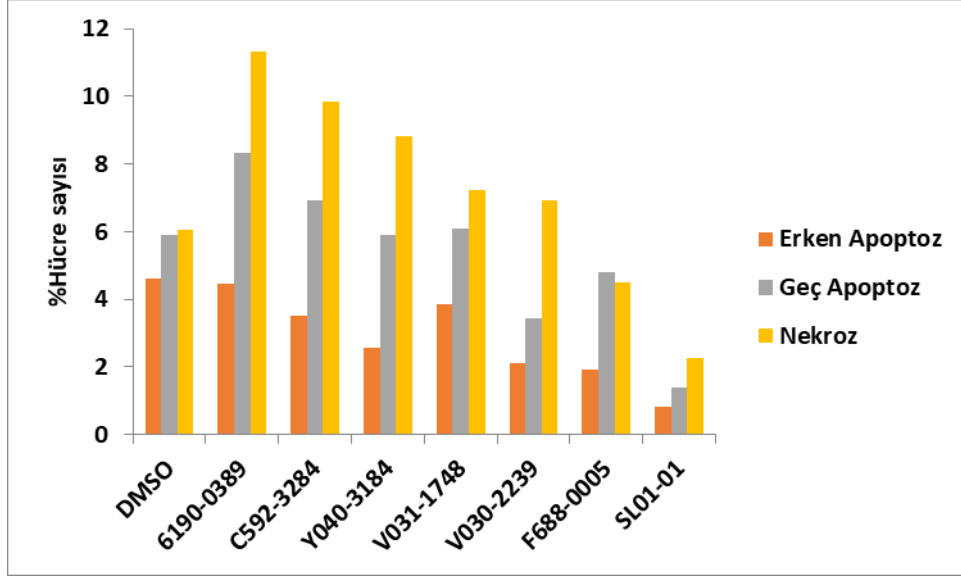
Şekil 4.36: a) SW480 hücreleri BAX, BCL-2 ve β -aktin antikorları görüntüsü b) BAX grafiği c) BCL-2 grafiği

4.4 Potansiyel İnhibitörlerin Oluşturduğu Apoptotik Etkinin Flow Sitometre İle Gösterilmesi

Flow sitometre uygulaması Bölüm 3.2.7’de gösterildiği gibi gerçekleştirildi. HT-29 hücreleri için belirlenen potansiyel inhibitörler uygulandı. elde edilen görüntülere ait veriler grafik olarak sunuldu. Yapılan çalışma sonucunda, pozitif kontrol olarak kullanılan SL01-01 inhibitörü ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 6190-0389 ve C592-3284 isimli inhibitörlerin geç apoptoz ve nekrozu tetiklediği belirlendi (Şekil 4.37).

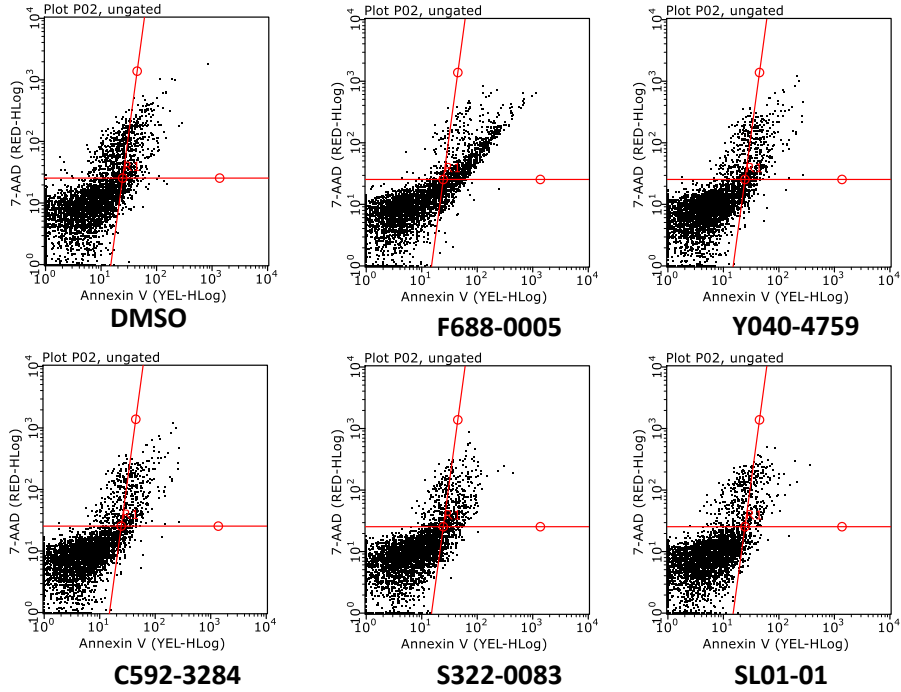


Şekil 4.37: HT-29 hücreleri flow sitometre görüntüsü

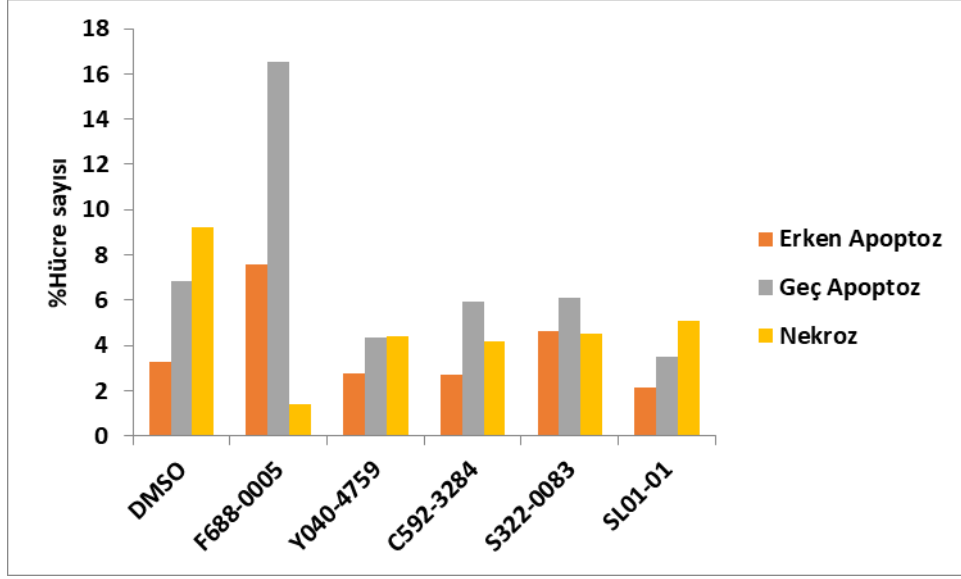


Şekil 4.38: HT-29 hücreleri flow sitometre grafiği

Yapılan çalışma sonucunda SW480 hücreleri için özellikle erken ve geç apoptozu indükleyen bileşiğin F688-0005 isimli potansiyel inhibitör olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.39).

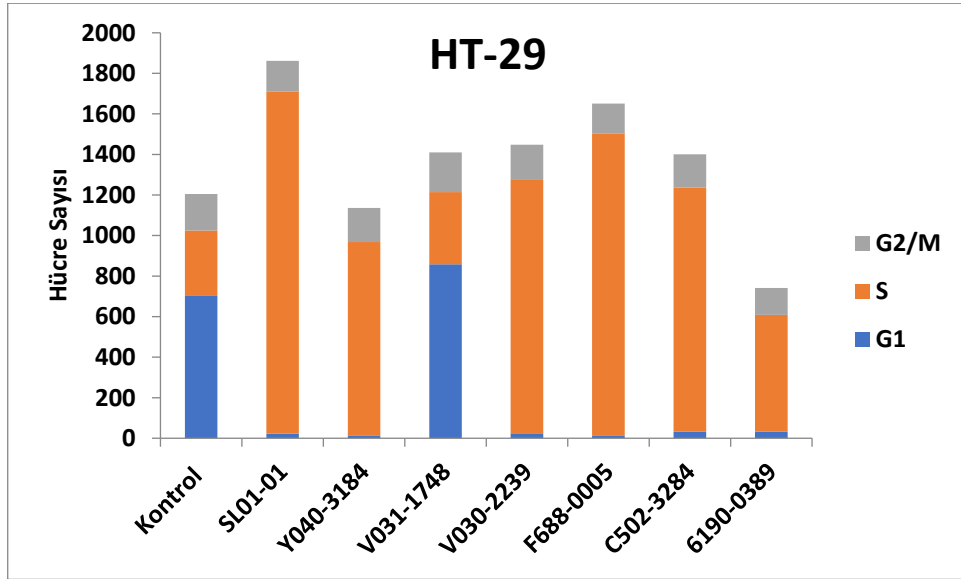


Şekil 4.39: SW480 hücreleri flow sitometre görüntüsü

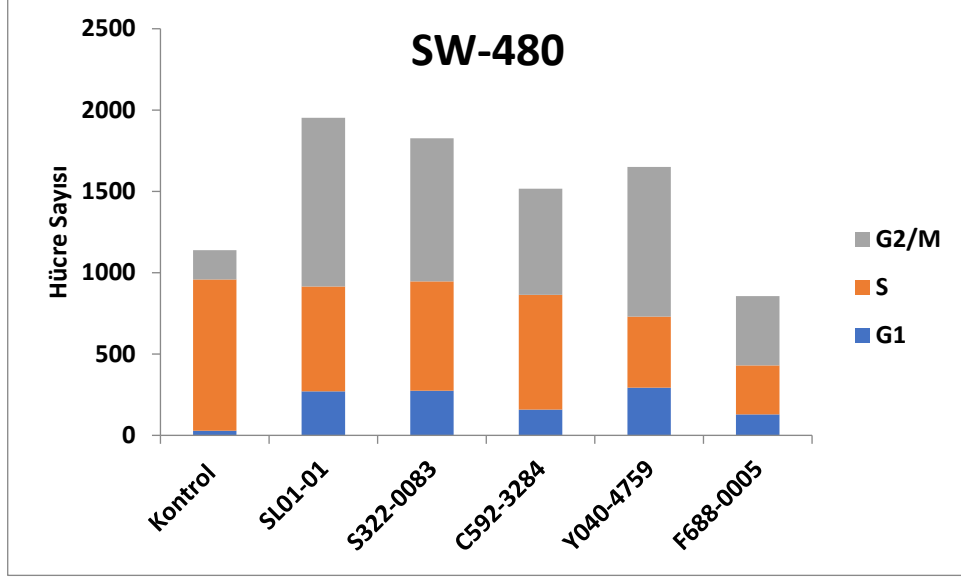


Şekil 4.40: SW480 hücreleri flow sitometre grafiği

PI hücre döngüsü analiz verileri incelendiğinde, HT-29 hücreleri için V031-1748 inhibitörü hariç diğer bileşiklerde hücrelerin sentez fazında biriktiği görüldü (Şekil 4.41).



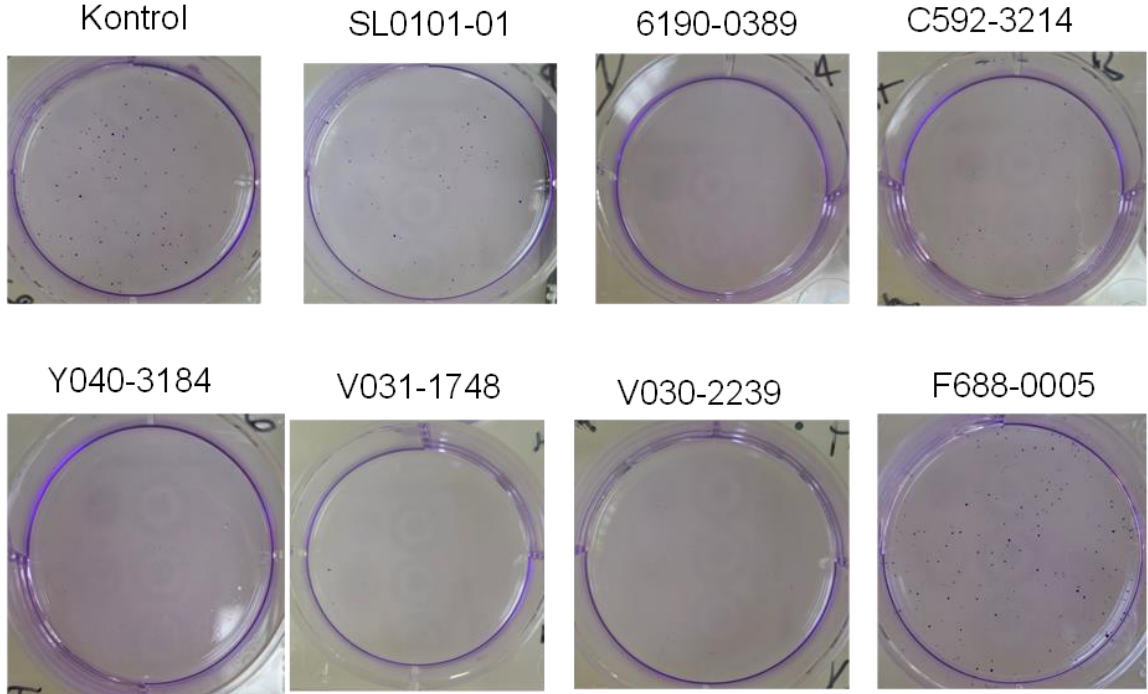
Şekil 4.41: HT-29 PI ile hücre siklusu evrelerinin karşılaştırmalı grafiği



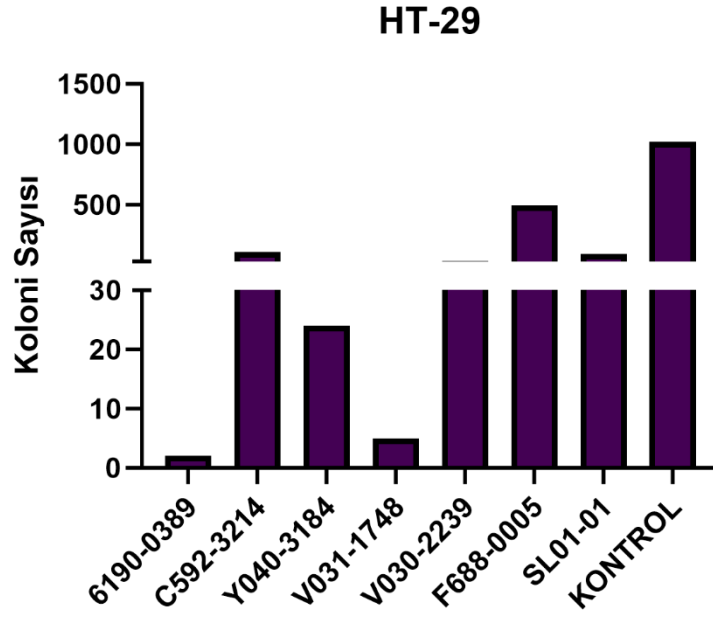
Şekil 4.42: SW480 PI ile hücre siklus evrelerinin karşılaştırmalı grafiği

4.5 Bileşiklerin Hücre Göçü ve Koloni Oluşturma Yetilerinin Belirlenmesi

Koloni formasyon deneyleri Bölüm 3.2.4'te gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Belirlenen potansiyel inhibitör adayları HT-29 hücreleri üzerine uygulandıktan sonra uygulanan inhibitörlerin koloni oluşturma etkilerini baskıladığı belirlenmiştir (Şekil 4.44).

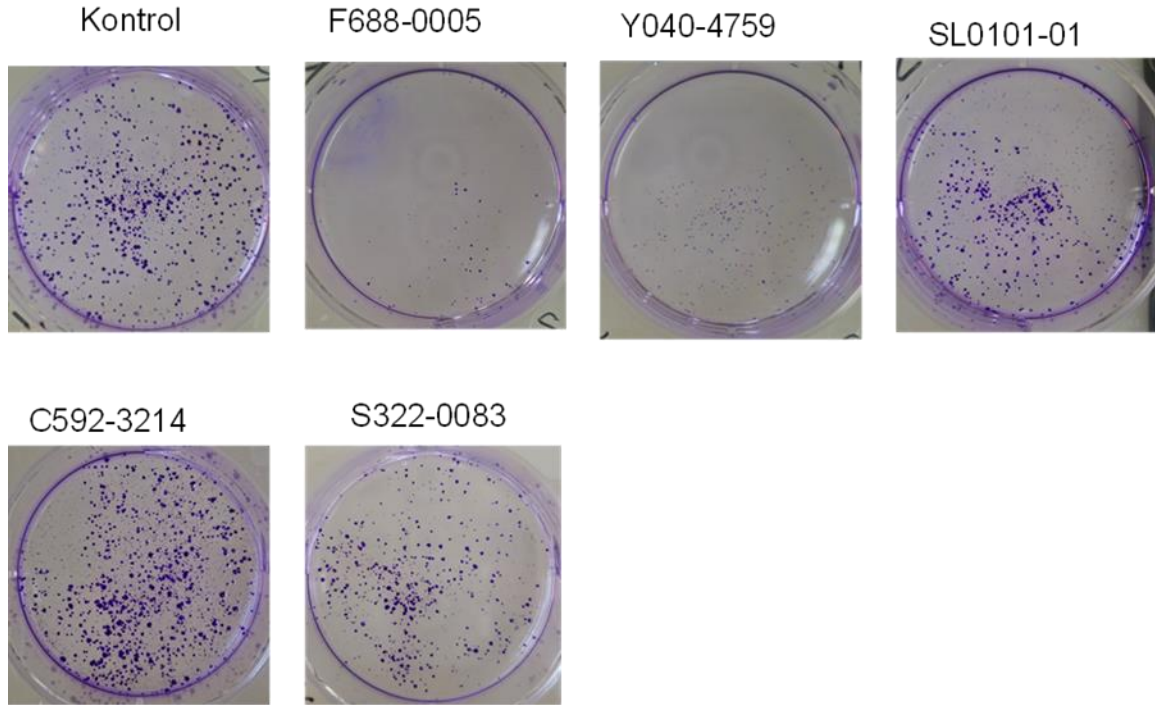


Şekil 4.43: HT-29 hücreleri koloni formasyon görüntüleri

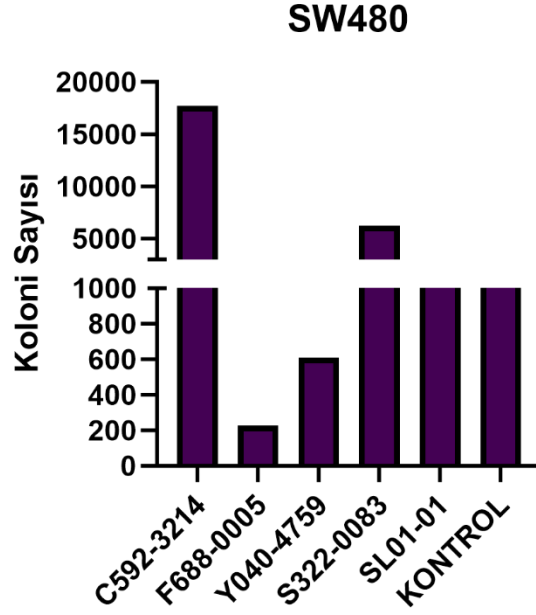


Şekil 4.44: HT-29 hücreleri koloni formasyon grafiği

SW480 hücrelerinde ise uygulanan F688-0005 ve Y040-4759 inhibitörlerinin koloni oluşumunu baskıladığı görülmüştür (Şekil 4.46).



Şekil 4.45: SW480 hücreleri koloni formasyon görüntüleri

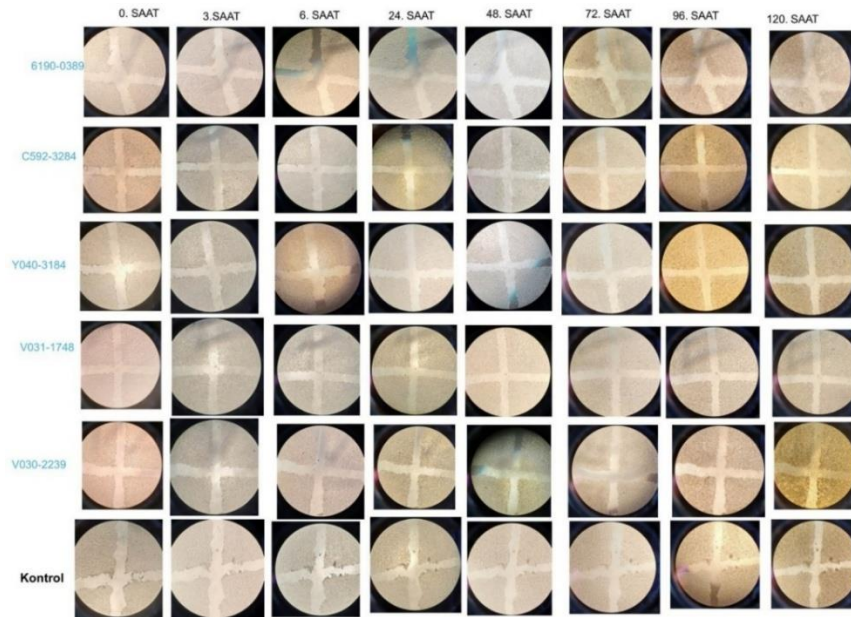


Şekil 4.46: SW480 hücreleri koloni formasyon grafiği

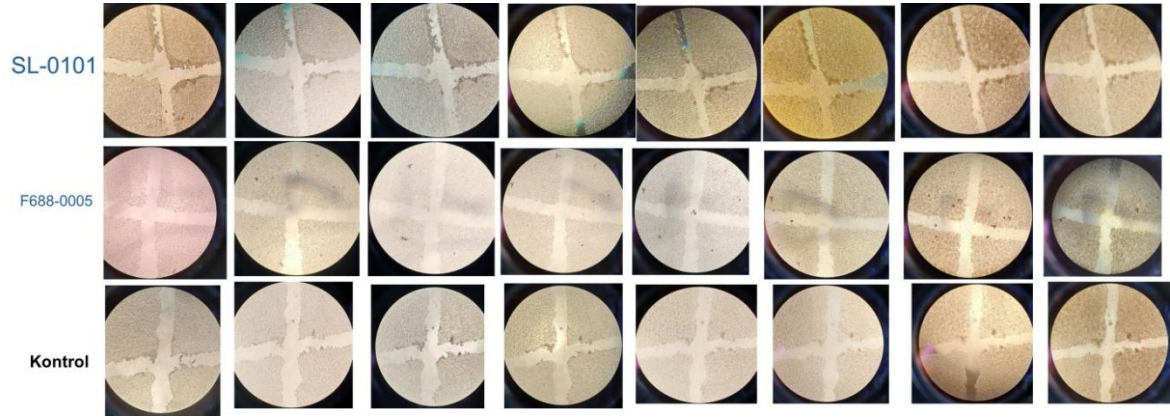
4.6 Seçilmiş Olan İnhibitörlerin Yara İyileştirme Etkilerinin Belirlenmesi

4.6.1 HT-29 hücrelerinde potansiyel inhibitörlerin yara iyileştirme etkisinin belirlenmesi

Çizik deneyleri Bölüm 3.2.5'te gösterildiği gibi gerçekleştirildi (Şekil 4.47).

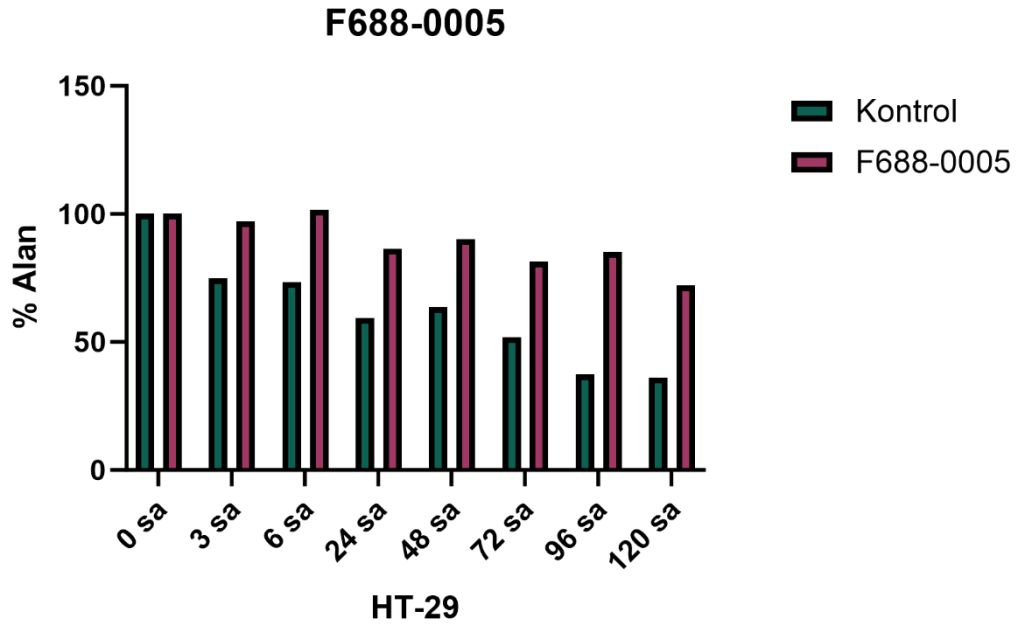


Şekil 4.47: HT-29 hücreleri çizik deneyi görüntüleri



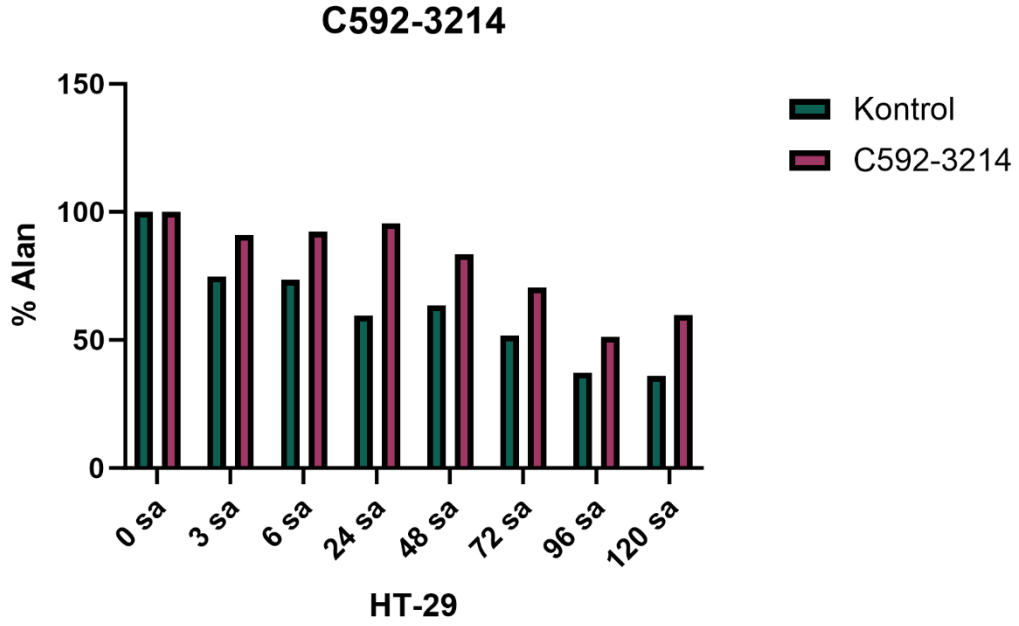
Şekil 4.47 (devam)

Yapılan deneyler sonucunda F688-0005 inhibitörünün HT-29 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini büyük ölçüde azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.48).



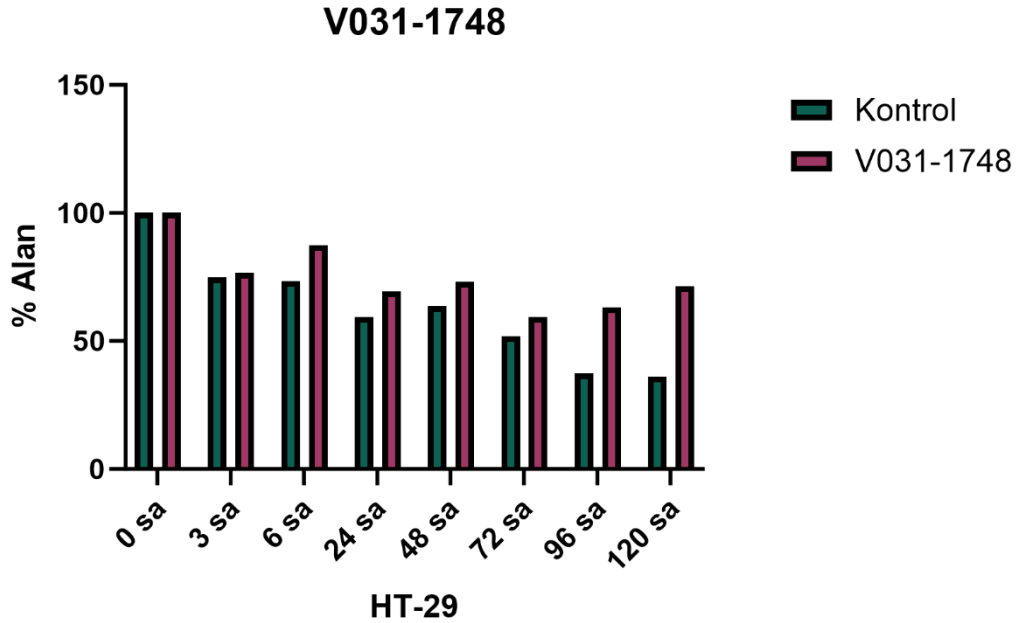
Şekil 4.48: F688-0005 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği

Yapılan deneyler sonucunda C592-3214 inhibitörünün HT-29 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.49).



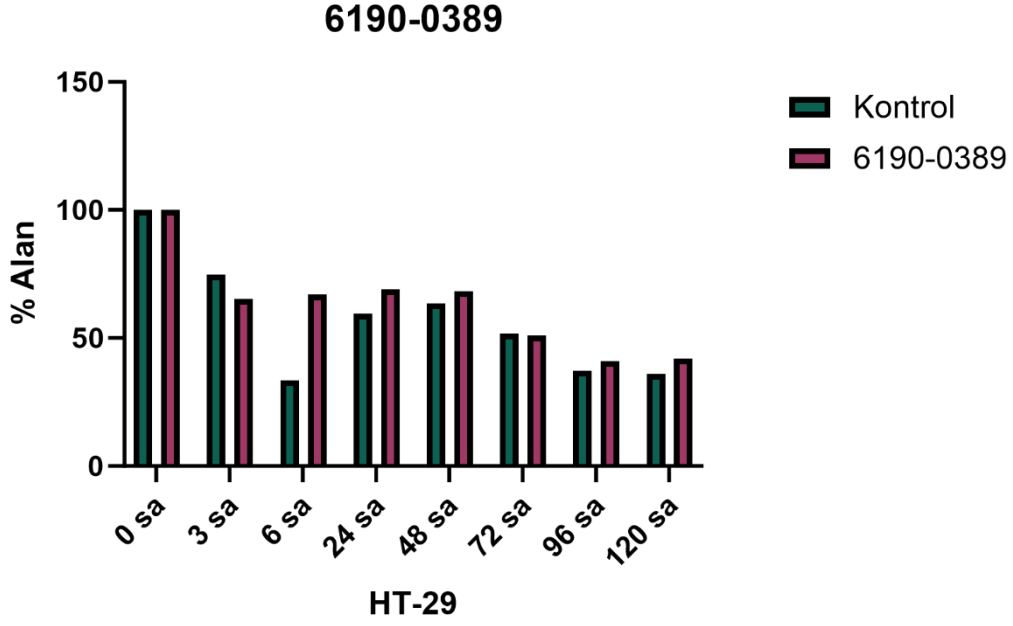
Şekil 4.49: C592-3214 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği

Yapılan deneyler sonucunda V031-1748 inhibitörünün HT-29 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini büyük ölçüde azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.50).



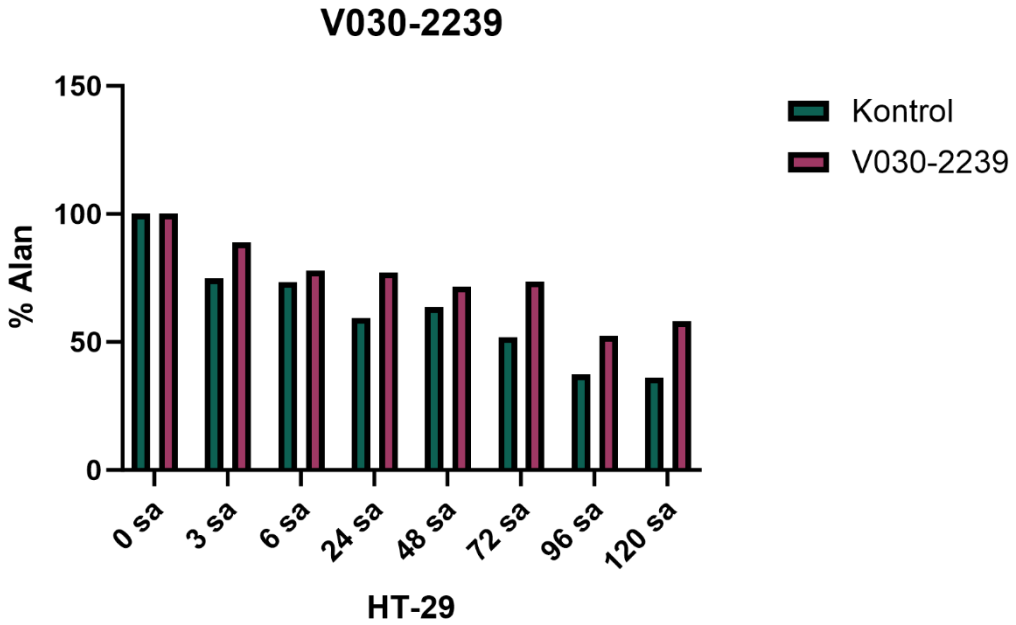
Şekil 4.50: V031-1748 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği

Yapılan deneyler sonucunda 6190-0389 inhibitörünün HT-29 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitesinde fazla bir değişiklik yaratmadığı bulgulanmıştır (Şekil 4.51).



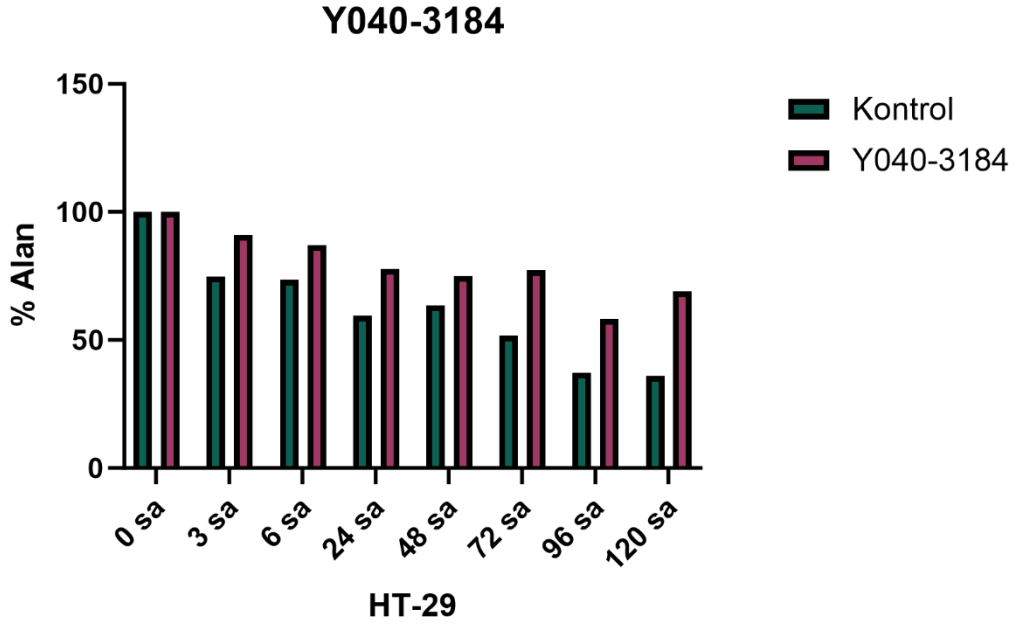
Şekil 4.51: 6190-0389 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği

Yapılan deneyler sonucunda V030-2239 inhibitörünün HT-29 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.52).



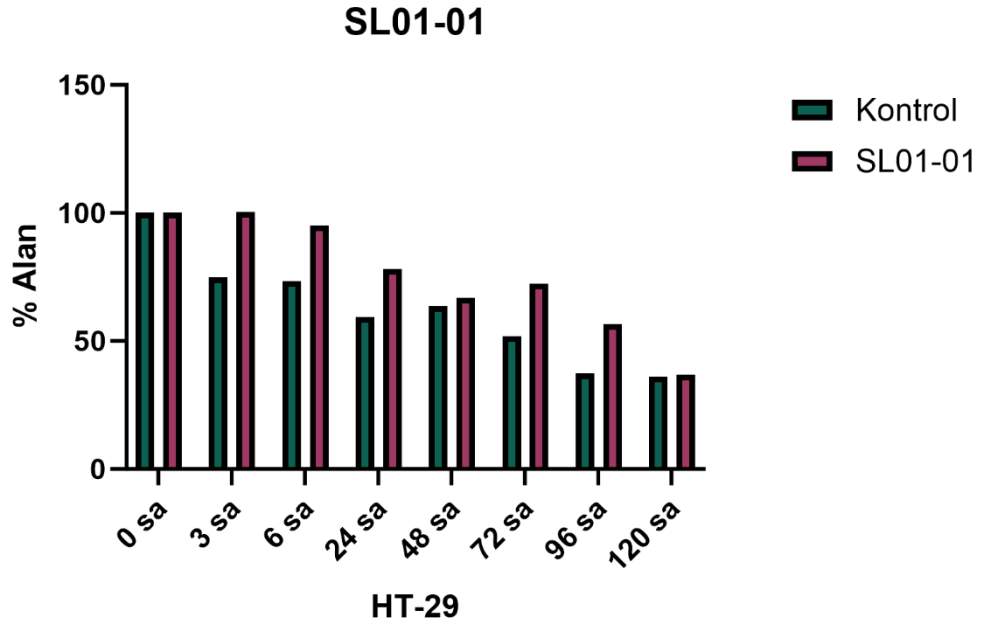
Şekil 4.52: V030-2239 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği

Yapılan deneyler sonucunda Y040-3184 inhibitörünün HT-29 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.53).



Şekil 4.53: Y040-3184 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği

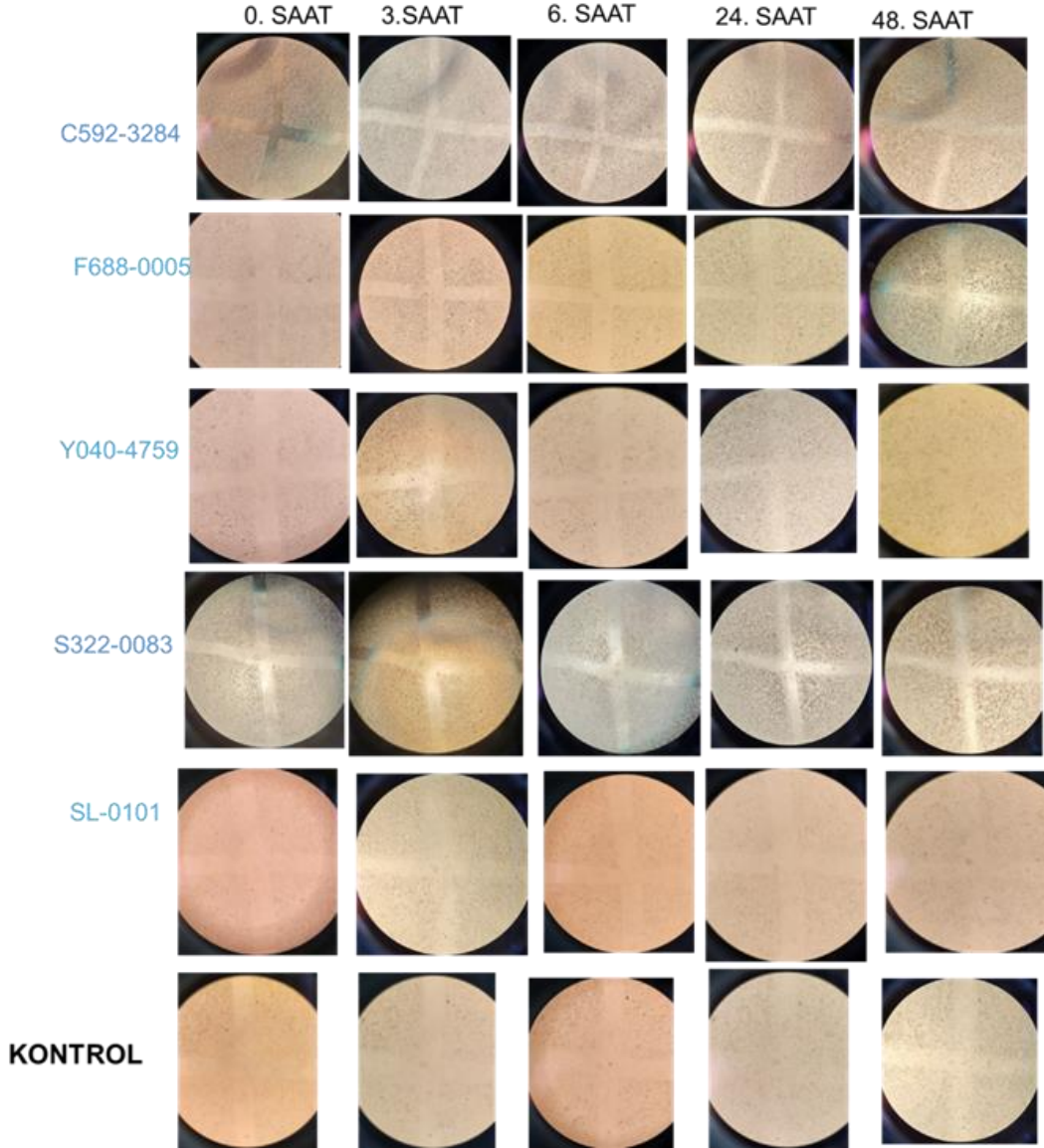
Yapılan deneyler sonucunda pozitif kontrol olan SL01-01 inhibitörünün HT-29 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.54).



Şekil 4.54: SL0101 bileşiği HT-29 hücre hattı çizik deneyi grafiği

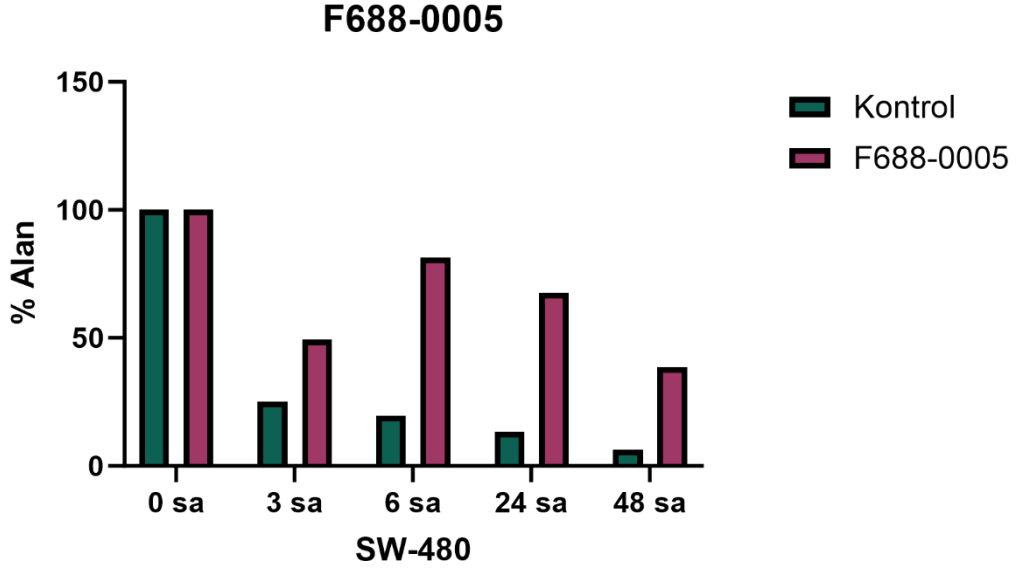
4.6.2 SW480 hücrelerinde potansiyel inhibitörlerin yara iyileştirme etkisinin belirlenmesi

SW480 hücreleri ile yapılan yaralanma deneyi sonucunda, F688-0005, C592-3284, S322-0083 ve SL01-01 bileşiklerinde % alanın kontrole kıyasla arttığı tespit edildi (Şekil 4.55).



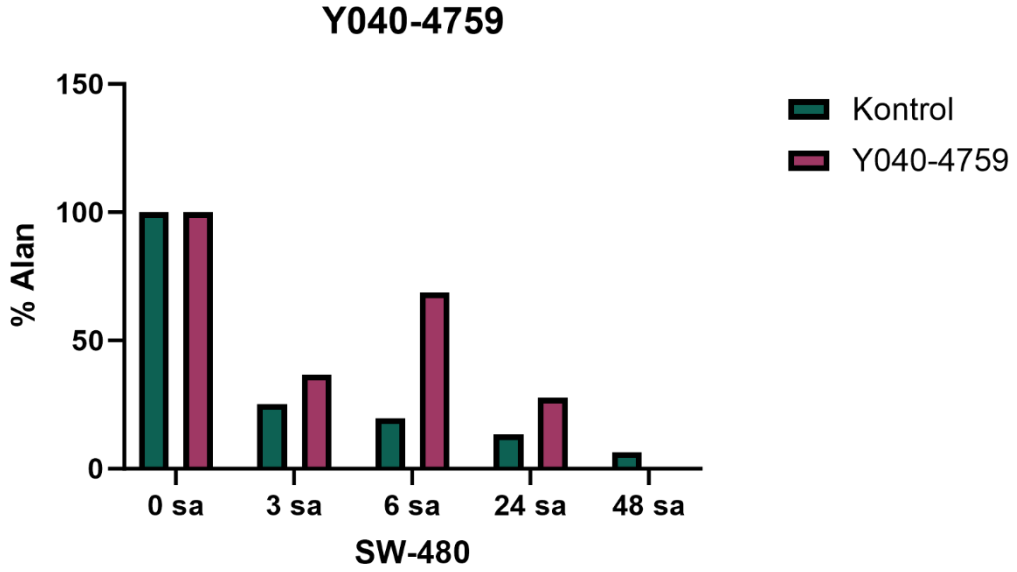
Şekil 4.55: SW480 hücre hattı çizik deneyi görüntüleri

Yapılan deneyler sonucunda F688-0005 inhibitörünün SW480 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini büyük ölçüde azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.56).



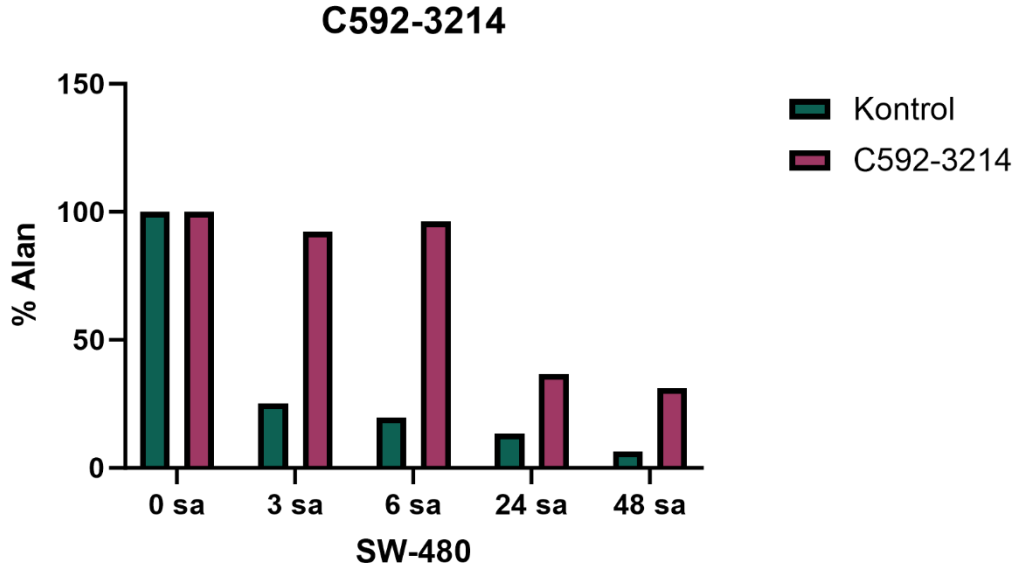
Şekil 4.56: F688-0005 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği

Yapılan deneyler sonucunda Y040-4759 inhibitörünün SW480 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.57).



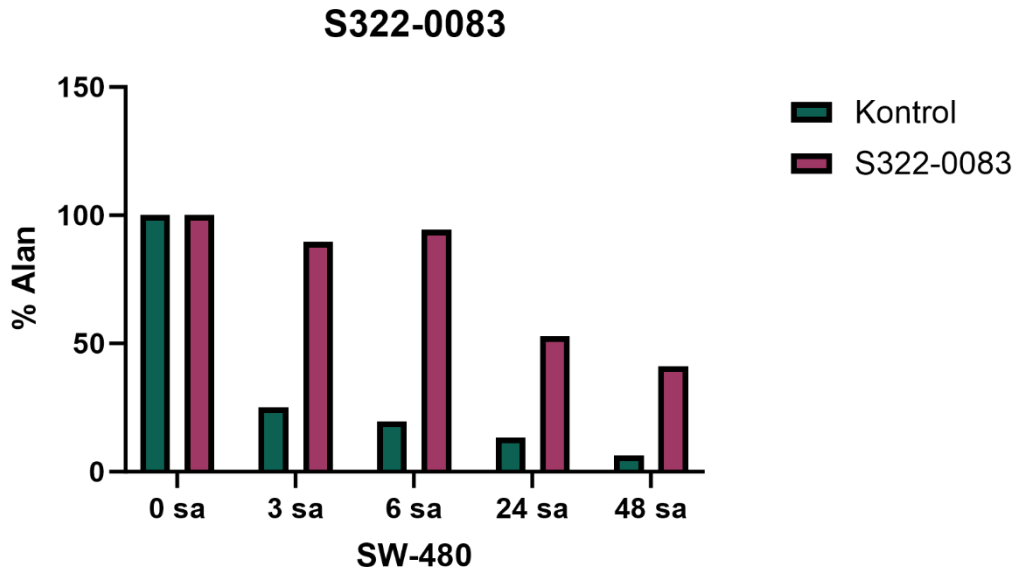
Şekil 4.57: Y040-4759 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği

Yapılan deneyler sonucunda C592-3284 inhibitörünün SW480 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini büyük ölçüde azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.58).



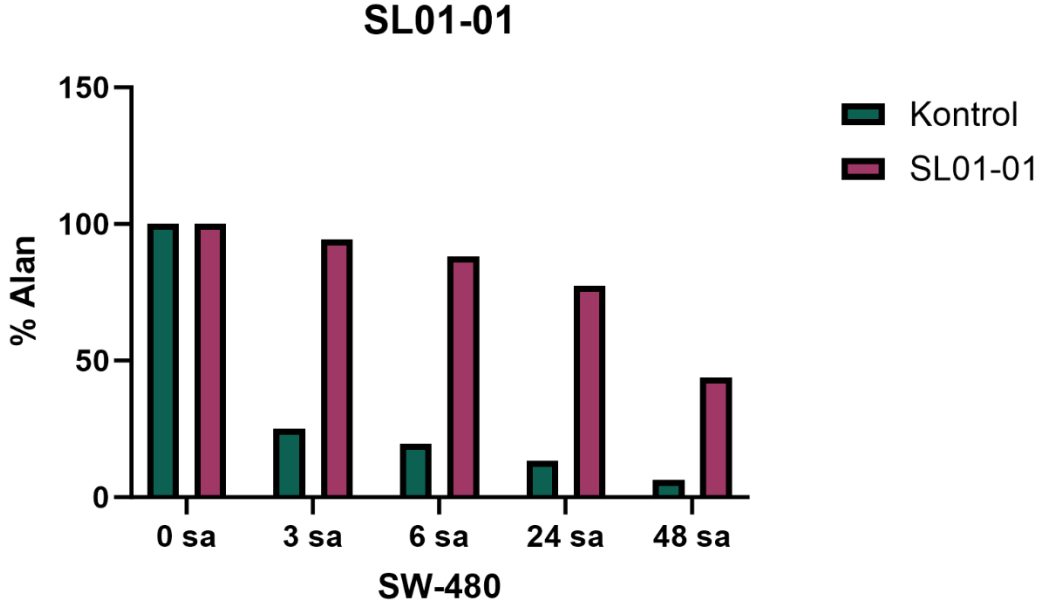
Şekil 4.58: C592-3284 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği

Yapılan deneyler sonucunda S322-0083 inhibitörünün SW480 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini büyük ölçüde azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.59).



Şekil 4.59: S322-0083 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği

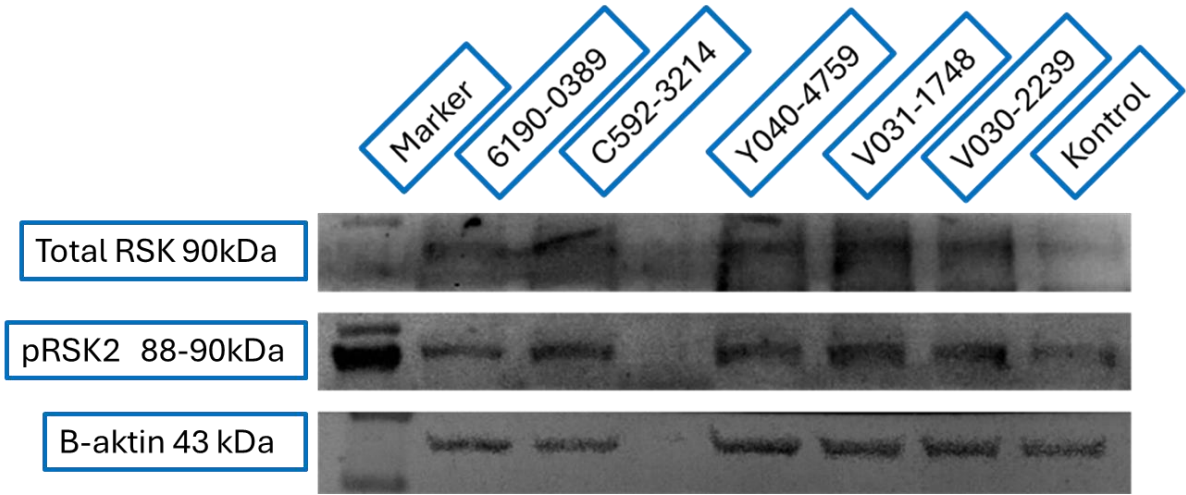
Yapılan deneyler sonucunda pozitif kontrol olan SL01-01 inhibitörünün SW480 hücrelerinin yara iyileştirme kapasitelerini azalttığı bulgulanmıştır (Şekil 4.60).



Şekil 4.60: SL0101 inhibitörü SW480 hücre hattı çizik deneyi grafiği

4.7 Seçilmiş Olan İnhibitörlerin RSK Yolağı Üzerindeki Aktvitelerinin Belirlenmesi

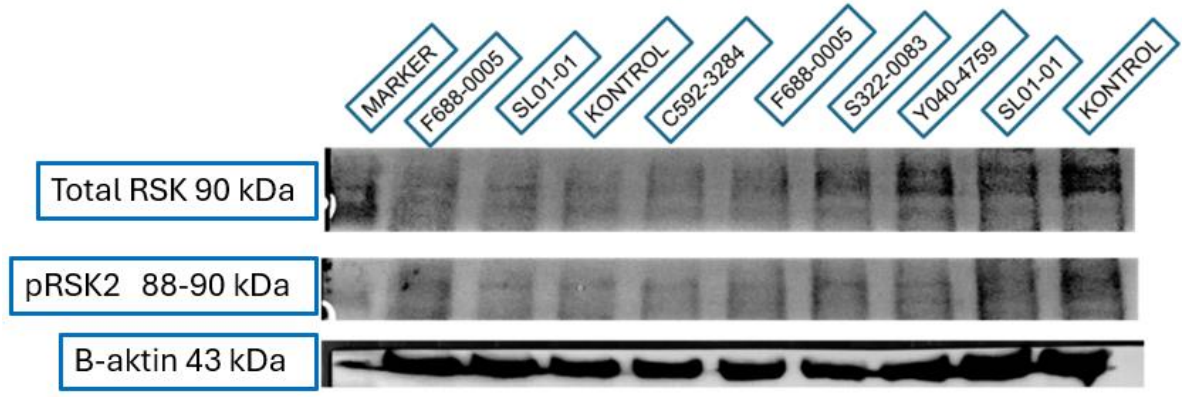
Potansiyel inhibitörlerin RSK1 ve RSK2 aktivitesine etkisi western blotting yöntemiyle Bölüm 3.2.6.4'te verilen protokol kullanılarak incelendi. Etkiler, SW480 ve HT-29 hücrelerinde değerlendirildi. İnhibitörler, IC₅₀ dozunda uygulandıktan 2 saat sonra, hücre pelletleri RIPA tamponu ile toplanarak alındı. Aynı zamanda 72 saate kazıma işlemi gerçekleştirildi. Erken ve geç saat olmak üzere iki tipte uygulamalar yapıldı. Bölüm atıfları yapmamız lazım. Antikor olarak toplam RSK ve RSK2 kullanıldı. Elde edilen bantlar, IMAGE J yazılımı ile densitometrik analiz edilip grafikler oluşturuldu. Çalışma sonucunda, HT-29 hücrelerinde F688-0005 bileşiğinin RSK ve pRSK2 seviyelerini ciddi oranda azalttığı gözlemlendi. Ayrıca, C592-3214 inhibitörü uygulandığında pRSK-2/RSK oranında belirgin bir düşüş tespit edildi (Şekil 4.61, Şekil 4.62, Şekil 4.63).



Şekil.4.61: HT-29 Hücre hattı RSK-pRSK görüntüsü

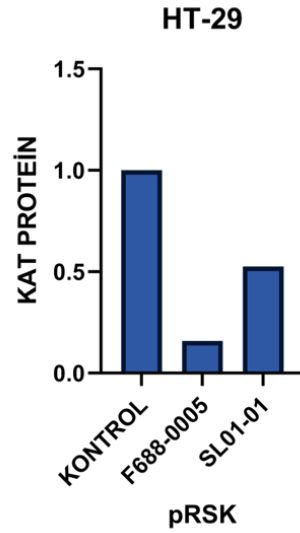


Şekil 4.62: HT-29 Hücre hattı RSK-pRSK grafiği



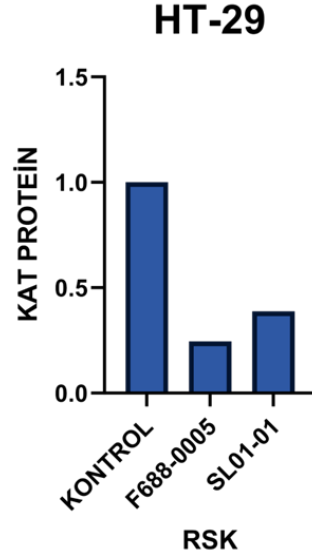
Şekil 4.63: pRSK ve RSK Western Blot görüntüleri soldan sağa marker, HT-29 F688-0005, HT-29 SL01-01, HT-29 Kontrol, SW480 Bileşikler, SW480 SL01-01, SW480 Kontrol

Yapılan analizler sonucunda F688-0005 inhibitörünün pRSK düzeyini pozitif kontrolümüze kıyasla HT-29 hücre hattında ciddi şekilde azalttığını görüyoruz (Şekil 4.63).



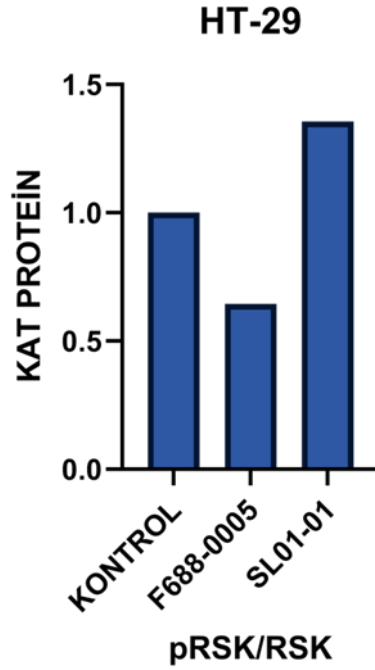
Şekil 4.64: HT-29 F688-0005 pRSK kat protein grafiği

Yapılan analizler sonucunda F688-0005 inhibitörünün RSK düzeyini pozitif kontrolümüze kıyasla HT-29 hücre hattında azalttığını görüyoruz (Şekil 4.64).



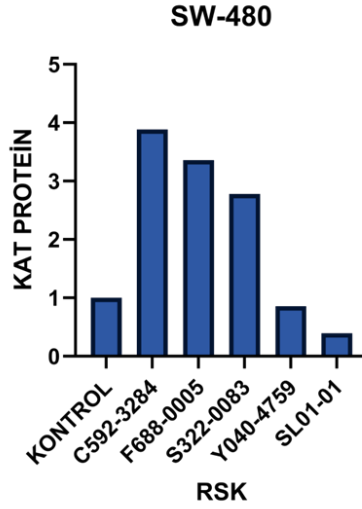
Şekil 4.65: HT-29 F688-0005 RSK kat protein grafiği

Yapılan analizler sonucunda F688-0005 inhibitörünün pRSK/RSK düzeyini pozitif kontrolümüze kıyasla HT-29 hücre hattında azalttığını görüyoruz (Şekil 4.65).



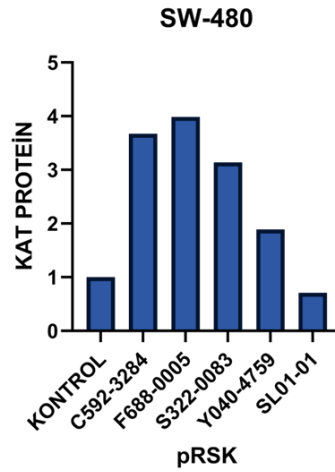
Şekil 4.66: HT-29 F688-0005 pRSK/RSK kat protein grafiği

SW480 hücre hattında western blot analizleri sonucunda oluşan RSK düzeyleri grafikte gösterildiği gibidir. Tüm inhibitörlerin RSK düzeyinde artış görülmüştür (Şekil 4.66).



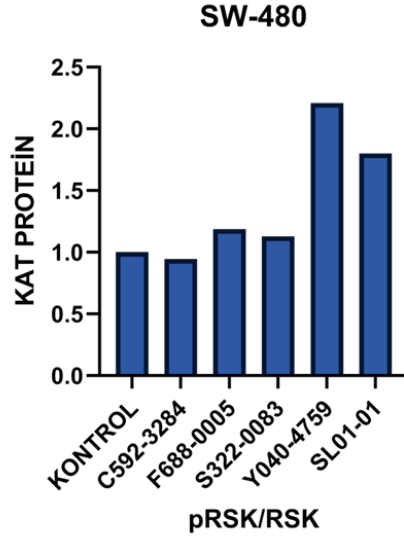
Şekil 4.67: SW480 Bileşikler RSK kat protein grafiği

SW480 hücre hattında western blot analizleri sonucunda oluşan RSK düzeyleri grafikte gösterildiği gibidir. Tüm inhibitörlerin pRSK düzeyinde artış görülmüştür (Şekil 4.67).



Şekil 4.68: SW480 pRSK kat protein grafiği

SW480 hücre hattında western blot analizleri sonucunda oluşan pRSK/RSK düzeyleri grafikte gösterildiği gibidir. Y040-4759 inhibitöründe pRSK oranının ciddi şekilde arttığı görülmüştür (Şekil 4.68).



Şekil 4.69: SW480 pRSK/RSK kat protein grafiği

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

RSK geni genel olarak hücre içinde kritik yollarda görev alan bir genidir [68]. Proliferasyon, hücre döngüsü, metastaz gibi kritik kanser yollarında yer alır. Bundan dolayı kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizmasında oldukça önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalar RSK'nın hücre içerisinde aktive olup proliferasyonu ve metastazı artırdığını [109], bazı inhibitörlerin *in vitro* çalışmalarında RSK genini hedef alarak kolon kanseri hücrelerini baskıladığını göstermiştir [93].

Literatürde RSK inhibitörlerinin terapötik amaçlı kullanımıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır, fakat bu inhibitörlerin neredeyse tamamı tedavi amaçlı kullanılamamaktadır. SL0101 inhibitörü, düşük kararlılık göstermekte ve düşük etkili olduğundan kullanım için uygun değildir [89]. BI-D1870 yüksek derişimde nonspesifik etki ve yetersiz farmakokinetik etki göstermektedir [92]. LJH685 ve LJ1308 düşük yarılanma ömrü ve *in vivo* çalışmalarda etkisinin az olduğu rapor edilmektedir [94]. BIX02565 hedef dışı etkilere sahiptir [96]. FMK inhibitörü ise yine kararlılık sorunu ile bilinmektedir [54]. Yalnızca PMD-026 inhibitörü oral kullanımda uygunluğuyla göze çarpmaktadır. Meme kanseri tedavisi için geliştirilen bu ilaç adayları ile prelinik çalışmalarda umut verici sonuçlar elde etmiştir [54].

Bu tez kapsamında halihazırda bulunan RSK inhibitörlerinin terapötik kullanımı sınırlı olduğundan kolon kanseri üzerinde yeni ve daha etkili tedavi stratejileri üretilmesi amacıyla ChemDiv kimyasal veri tabanından temin edilen indol ve triazol iskeletli 10 bileşiğin ve diğer bir bileşiğin *in vitro* çalışmalarıyla potansiyellerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

RSK genine yönelik sanal tarama ve moleküler modelleme çalışmaları ile belirlenen ve temin edilen potansiyel inhibitörlerin *in vitro* etkinlikleri SW480 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ile sağlıklı HUVEC hücre hattı kullanılarak kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ile, test edilen bileşiklerin hücre hattına özgü farklı etkiler gösterdiğini ve bazı bileşiklerin moleküler ve hücre düzeyinde apoptoz süreçlerini etkin biçimde tetiklediğini ortaya koymuştur. Bu durum, HT-29 ve SW480 hücre hatları arasındaki mutasyon farklılıklarından kaynaklandığını düşünmek mümkündür.

SW480 hücre hattı tek başına değerlendirildiğinde, IC₅₀ değerlerine göre en etkili bileşiklerin sırasıyla C592-3214, F688-0005, Y040-4759 ve S322-0083 olduğu görülmektedir. Bu sonuç, özellikle C592-3214 ve F688-0005 bileşiklerinin SW480 hücrelerinde yüksek

antiproliferatif etki gösterdiğini göstermektedir. F688-0005 bileşiğinin koloni formasyon ve yara iyileşme testlerinde hücresel düzeyde apoptozu indüklemesi, bu bileşiğin yalnızca hücre çoğalmasını baskılamadığını, aynı zamanda programlı hücre ölümünü aktif hale getirdiğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, C592-3284 ve S322-0083 bileşiklerinin moleküler düzeyde apoptoz indüksiyonu sağlaması, bu bileşiklerin hücre içi sinyal yollarına doğrudan etki ettiğini ve muhtemelen RSK inhibisyonu aracılığıyla hücresel ölümü tetiklediğini göstermektedir.

HT-29 hücre hattına bakıldığında ise daha fazla sayıda bileşiğin apoptotik süreçleri tetiklediği gözlenmiştir. IC₅₀ değeri bakımından en düşük etki V031-1748 bileşiğinde gözlenirse de, Y040-4759, 6190-0389, V030-2239, C592-3284 ve V031-1748 bileşiklerinin hem hücresel hem de moleküler düzeyde apoptoz süreçlerine etki ettiği görülmüştür. Bu durum, HT-29 hücre hattının bazı bileşiklere karşı daha duyarlı olduğunu ya da bu bileşiklerin hücreye giriş ve etki mekanizmalarının bu hücre tipinde daha belirgin olduğunu düşündürmektedir.

Sağlıklı hücre modeli olarak kullanılan HUVEC hücreleri üzerinden yapılan değerlendirmede, toksik etki gösteren bileşik sayısının sınırlı olması, bazı inhibitörlerin seçici toksisite potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur. Özellikle C592-3214 bileşiğinin üç hücre hattında da toksik etki göstermesi, bu bileşiğin yüksek potansiyele sahip olmasına rağmen seçicilik açısından dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu durum, etkili bileşiklerin her zaman güvenli olmayabileceğini ve potansiyel inhibitörlerin geliştirilme sürecinde hem etkinlik hem de güvenlik profillerinin birlikte göz önünde bulundurulmasının önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmanın dikkat çekici bir yönü de, aynı bileşiğin farklı hücre hatlarında gösterdiği farklı etkiler olmuştur. Örneğin, bazı bileşikler SW480 hattında belirgin apoptoz etkisi gösterirken HT-29 hattında daha sınırlı etki sergilemiştir. Bu farklılıklar, RSK ekspresyon düzeyleri, hücre içi hedef proteinlerin varlığı veya hücrelerin genel direnç mekanizmalarından kaynaklanıyor olabilir. Bu bağlamda, moleküler düzeyde yapılacak daha detaylı analizler, her bir bileşiğin hücre tipi spesifik etki mekanizmalarının ortaya konmasına katkı sağlayacaktır.

Elde edilen bulgular, RSK inhibitörlerinin kolorektal kanser tedavisinde potansiyel ajanlar olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Özellikle F688-0005, C592-3284, Y040-4759 ve 6190-0389 bileşikleri, hem hücresel hem de moleküler düzeyde gösterdikleri etkinlik ile öne çıkmakta ve ileri aşama deneylerde değerlendirilmek üzere güçlü adaylar olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte sağlıklı hücre hattı olarak kullanılan HUVEC hücrelerinde gözlenen toksik etkiler, bu bileşiklerin sistemik uygulamalarda oluşturabileceği olası yan etkilerin de dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Deney sonuçlarının tablolatırılmış hali Tablo 5.1’de gösterilmektedir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında yapılan *in vitro* analizler, RSK inhibitörlerinin hücre tipi spesifik etkiler gösterebildiğini ve bazı bileşiklerin hem apoptotik aktivite hem de seçici toksisite bakımından dikkat çekici özellikler taşıdığını göstermiştir. İlerleyen süreçte yapılacak *in-vivo* çalışmalar ve farmakokinetik değerlendirmeler ile bu bileşiklerin klinik açıdan taşıdığı potansiyel daha net ortaya konulabilecektir. Ayrıca, bileşiklerin doğrudan hedeflerine bağlanma kapasitelerini ortaya koyacak biyokimyasal testler de etki mekanizmalarının daha ayrıntılı anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Tablo 5.1: Sonuç tablosu

Ligand	Yöntem	Veri Tabanı	PDB ve Yerleştirme Skoru (kcal/mol)	IC ₅₀ SW480	IC ₅₀ HT-29	IC ₅₀ HUVEC	Moleküler Apoptoz	Hücresel Apoptoz
Y040-3184	Screen library (APIO-EE-07)	ChemDiv / İndol	2Z7Q (-7.752)	≥150	69.321 2	≥150	-	-
Y040-4759	Farmakofor haritalama (APIO-EE-07)	ChemDiv / İndol	2Z7R (-9.192)	26.532	≥150	74.31	+(HT-29), +(SW480)	-
F688-0005	Farmakofor haritalama (APIO-EE-07)	ChemDiv / Triazol	2Z7R (-8.556)	63.614	61.056 3	≥150	-	+(SW480)
6190-0389	Screen library (APIO-EE-07)	ChemDiv / Triazol	2Z7Q (-7.849)	≥150	78.372 7	≥150	-	+(HT-29)
D217-0222	Yapı esaslı	ChemDiv / Triazol	2Z7R (-9.535)	≥150	≥150	≥150	-	-
Y206-0033	Yapı esaslı	ChemDiv / Triazol	2Z7Q (-11.27)	≥150	≥150	≥150	-	-
V030-2239	-	ChemDiv / İndol	-	≥150	54.135 5	91.06	+(HT-29)	-
S322-0083	Yapı esaslı	ChemDiv / İndol	5D9K (-9.310)	17.703 7	≥150	≥150	+(SW480)	-
C592-3214	Yapı esaslı	ChemDiv / Triazol	3UBD (-8.193)	64.026 8	75.552 3	81.99	+(HT-29)	+(HT-29)
V031-1748	Yapı esaslı	ChemDiv / İndol	3UBD (-9.236)	≥150	31.669 6	≥150	+(HT-29)	-

6. KAYNAKLAR

- [1] **M. Ervik, F. Lam, M. Laversanne, J. Ferlay, and F. Bray**, "Global cancer observatory: cancer over time," *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*, 2021.
- [2] **G.-H. Yu, S.-F. Li, R. Wei, and Z. Jiang**, "Diabetes and colorectal cancer risk: clinical and therapeutic implications," *Journal of diabetes research*, vol. 2022, no. 1, p. 1747326, 2022.
- [3] **S. D. Markowitz and M. M. Bertagnolli**, "Molecular basis of colorectal cancer," *New England journal of medicine*, vol. 361, no. 25, pp. 2449-2460, 2009.
- [4] **C. C. Pritchard and W. M. Grady**, "Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice," *Gut*, vol. 60, no. 1, pp. 116-129, 2011.
- [5] **G. Roshandel, F. Ghasemi-Kebria, and R. Malekzadeh**, "Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention," *Cancers*, vol. 16, no. 8, p. 1530, 2024.
- [6] **S. Cai, Y. Li, Y. Ding, K. Chen, and M. Jin**, "Alcohol drinking and the risk of colorectal cancer death: a meta-analysis," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 23, no. 6, pp. 532-539, 2014.
- [7] **V. Fedirko et al.**, "Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose–response meta-analysis of published studies," *Annals of oncology*, vol. 22, no. 9, pp. 1958-1972, 2011.
- [8] **M. Pande et al.**, "Smoking and colorectal cancer in Lynch syndrome: results from the Colon Cancer Family Registry and the University of Texas MD Anderson Cancer Center," *Clinical cancer research*, vol. 16, no. 4, pp. 1331-1339, 2010.
- [9] **D. Limsui et al.**, "Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, vol. 102, no. 14, pp. 1012-1022, 2010.
- [10] **T. T. Nguyen, T. T. Ung, N. H. Kim, and Y. Do Jung**, "Role of bile acids in colon carcinogenesis," *World journal of clinical cases*, vol. 6, no. 13, p. 577, 2018.
- [11] **P. Ye, Y. Xi, Z. Huang, and P. Xu**, "Linking obesity with colorectal cancer: epidemiology and mechanistic insights," *Cancers*, vol. 12, no. 6, p. 1408, 2020.
- [12] **J. Vallis and P. P. Wang**, "The role of diet and lifestyle in colorectal cancer incidence and survival," *Exon Publications*, pp. 13-24, 2022.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [13] **F. Lyon**, "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans," *World health organization, International agency for research on cancer. available at publication@ iarc. fr*, 2014.
- [14] **M. Kim and K. Park**, "Dietary fat intake and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies," *Nutrients*, vol. 10, no. 12, p. 1963, 2018.
- [15] **S. M. Smith and W. W. Vale**, "The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress," *Dialogues in clinical neuroscience*, vol. 8, no. 4, pp. 383-395, 2006.
- [16] **B. Mravec, M. Tibensky, and L. Horvathova**, "Stress and cancer. Part I: Mechanisms mediating the effect of stressors on cancer," *Journal of neuroimmunology*, vol. 346, p. 577311, 2020.
- [17] **M. L. Oliveira et al.**, "A Perspective Review on Diet Quality, Excess Adiposity, and Chronic Psychosocial Stress and Implications for Early-Onset Colorectal Cancer," *The Journal of Nutrition*, 2024.
- [18] **H. Sung et al.**, "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 71, no. 3, pp. 209-249, 2021.
- [19] **L. Valle et al.**, "Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis," *Molecular aspects of medicine*, vol. 69, pp. 10-26, 2019.
- [20] **D. P. Taylor et al.**, "How well does family history predict who will get colorectal cancer? Implications for cancer screening and counseling," *Genetics in Medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 385-391, 2011.
- [21] **M. Ma, Z. Zheng, J. Li, Y. He, W. Kang, and X. Ye**, "Association between the gut microbiota, inflammatory factors, and colorectal cancer: Evidence from Mendelian randomization analysis," *Frontiers in Microbiology*, vol. 15, p. 1309111, 2024.
- [22] **M. Rebersek**, "Gut microbiome and its role in colorectal cancer," *BMC cancer*, vol. 21, no. 1, p. 1325, 2021.
- [23] **G. Casey, D. Conti, R. Haile, and D. Duggan**, "Next generation sequencing and a new era of medicine," *Gut*, vol. 62, no. 6, pp. 920-932, 2013.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [24] **G. Poulogiannis et al.**, "Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer," *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, vol. 220, no. 3, pp. 338-347, 2010.
- [25] **M. J. Arends**, "Pathways of colorectal carcinogenesis," *Applied immunohistochemistry & molecular morphology*, vol. 21, no. 2, pp. 97-102, 2013.
- [26] **E. R. Fearon and B. Vogelstein**, "A genetic model for colorectal tumorigenesis," *cell*, vol. 61, no. 5, pp. 759-767, 1990.
- [27] **P. J. Morin et al.**, "Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC," *Science*, vol. 275, no. 5307, pp. 1787-1790, 1997.
- [28] **M. Bienz and H. Clevers**, "Linking colorectal cancer to Wnt signaling," *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 311-320, 2000.
- [29] **G. Poulogiannis, I. M. Frayling, and M. J. Arends**, "DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome," *Histopathology*, vol. 56, no. 2, pp. 167-179, 2010.
- [30] **M. F. Müller, A. E. Ibrahim, and M. J. Arends**, "Molecular pathological classification of colorectal cancer," *Virchows Archiv*, vol. 469, pp. 125-134, 2016.
- [31] **N. Behranvand et al.**, "Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment," *Cancer immunology, immunotherapy*, vol. 71, no. 3, pp. 507-526, 2022.
- [32] **T. Watanabe et al.**, "Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer," *International journal of clinical oncology*, vol. 20, pp. 207-239, 2015.
- [33] **S. Dorudi, R. J. Steele, and C. S. McArdle**, "Surgery for colorectal cancer," *British medical bulletin*, vol. 64, no. 1, pp. 101-118, 2002.
- [34] **D. Theodorescu**, "Cancer cryotherapy: evolution and biology," *Reviews in urology*, vol. 6, no. Suppl 4, p. S9, 2004.
- [35] **X. Jiang, Z. Ji, X. Lei, C. Liu, and F. Yuan**, "Suitable T stage for cryosurgery to spare the anus in patients with low rectal cancer," *Cryobiology*, vol. 111, pp. 121-125, 2023.
- [36] **J. A. Joyce and D. T. Fearon**, "T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment," *Science*, vol. 348, no. 6230, pp. 74-80, 2015.
- [37] **H. Menon et al.**, "Role of radiation therapy in modulation of the tumor stroma and microenvironment," *Frontiers in immunology*, vol. 10, p. 193, 2019.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [38] **M. G. Haddock**, "Intraoperative radiation therapy for colon and rectal cancers: a clinical review," *Radiation Oncology*, vol. 12, pp. 1-8, 2017.
- [39] **C. Tofthagen**, "Surviving chemotherapy for colon cancer and living with the consequences," *Journal of palliative medicine*, vol. 13, no. 11, pp. 1389-1391, 2010.
- [40] **S. Ades**, "Adjuvant chemotherapy for colon cancer in the elderly: moving from evidence to practice," *Oncology*, vol. 23, no. 2, pp. 162-162, 2009.
- [41] **E. Dickens and S. Ahmed**, "Principles of cancer treatment by chemotherapy," *Surgery (Oxford)*, vol. 36, no. 3, pp. 134-138, 2018.
- [42] **J. Bhosle and G. Hall**, "Principles of cancer treatment by chemotherapy," *Surgery (Oxford)*, vol. 27, no. 4, pp. 173-177, 2009.
- [43] **J. Cassidy**, "Benefits and drawbacks of the use of oral fluoropyrimidines as single-agent therapy in advanced colorectal cancer," *Clinical colorectal cancer*, vol. 5, pp. S47-S50, 2005.
- [44] **M. L. Veronese and P. J. O'Dwyer**, "Monoclonal antibodies in the treatment of colorectal cancer," *European Journal of Cancer*, vol. 40, no. 9, pp. 1292-1301, 2004.
- [45] **S. J. Cohen, R. B. Cohen, and N. J. Meropol**, "Targeting signal transduction pathways in colorectal cancer—more than skin deep," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23, no. 23, pp. 5374-5385, 2005.
- [46] **H. F. Dvorak**, "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy," *Journal of clinical oncology*, vol. 20, no. 21, pp. 4368-4380, 2002.
- [47] **V. Grunwald and M. Hidalgo**, "Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 95, no. 12, pp. 851-867, 2003.
- [48] **R. Anjum and J. Blenis**, "The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 9, no. 10, pp. 747-758, 2008.
- [49] **Bj, C., Yi Zhao, David E. Moller**, "Divergent Functional Roles for p90rsk Kinase Domains (*)." *Journal of Biological Chemistry* 270(32): 18848-18852, 1995.
- [50] **P. P. Roux, S. A. Richards, and J. Blenis**, "Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity," *Molecular and cellular biology*, 2003.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [51] **Y. Romeo, X. Zhang, and P. P. Roux**, "Regulation and function of the RSK family of protein kinases," *Biochemical Journal*, vol. 441, no. 2, pp. 553-569, 2012.
- [52] **P. P. Roux and J. Blenis**, "MAPK signaling in human diseases," *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms, Volume 2*, pp. 135-149, 2007.
- [53] **T. L. Fisher and J. Blenis**, "Evidence for two catalytically active kinase domains in pp90rsk," *Molecular and cellular biology*, 1996.
- [54] **M. Youn, J. O. Gomez, K. Mark, and K. M. Sakamoto**, "RSK isoforms in acute myeloid leukemia," *Biomedicines*, vol. 9, no. 7, p. 726, 2021.
- [55] **B. A. Dummler et al.**, "Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 14, pp. 13304-13314, 2005.
- [56] **M. Zeniou, T. Ding, E. Trivier, and A. Hanauer**, "Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin–Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning," *Human molecular genetics*, vol. 11, no. 23, pp. 2929-2940, 2002.
- [57] **R. Lara, M. J. Seckl, and O. E. Pardo**, "The p90 RSK family members: common functions and isoform specificity," *Cancer research*, vol. 73, no. 17, pp. 5301-5308, 2013.
- [58] **A. Carriere, H. Ray, J. Blenis, and P. P. Roux**, "The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade," *Front Biosci*, vol. 13, no. 10, pp. 4258-4275, 2008.
- [59] **C. Sutherland et al.**, "Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2," *European journal of biochemistry*, vol. 217, no. 2, pp. 715-722, 1993.
- [60] **S. A. Richards, J. Fu, A. Romanelli, A. Shimamura, and J. Blenis**, "Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK," *Current Biology*, vol. 9, no. 15, pp. 810-820, 1999.
- [61] **C. J. Jensen, M.-B. Buch, T. O. Krag, B. A. Hemmings, S. Gammeltoft, and M. Frödin**, "90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 38, pp. 27168-27176, 1999.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [62] **M. Frödin *et al.***, "A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation," *The EMBO journal*, 2002.
- [63] **U. Doehn, S. Gammeltoft, S.-H. Shen, and C. J. Jensen**, "p90 ribosomal S6 kinase 2 is associated with and dephosphorylated by protein phosphatase 2C δ ," *Biochemical Journal*, vol. 382, no. 2, pp. 425-431, 2004.
- [64] **S. Kang *et al.***, "FGFR3 activates RSK2 to mediate hematopoietic transformation through tyrosine phosphorylation of RSK2 and activation of the MEK/ERK pathway," *Cancer cell*, vol. 12, no. 3, pp. 201-214, 2007.
- [65] **S. Kang *et al.***, "Epidermal growth factor stimulates RSK2 activation through activation of the MEK/ERK pathway and src-dependent tyrosine phosphorylation of RSK2 at Tyr-529," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 8, pp. 4652-4657, 2008.
- [66] **R. Zaru, N. Ronkina, M. Gaestel, J. S. C. Arthur, and C. Watts**, "The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways," *Nature immunology*, vol. 8, no. 11, pp. 1227-1235, 2007.
- [67] **T. Houles and P. P. Roux**, "Defining the role of the RSK isoforms in cancer," in *Seminars in cancer biology*, 2018, vol. 48: Elsevier, pp. 53-61.
- [68] **X. Wang, M. Janmaat, A. Beugnet, F. E. Paulin, and C. G. Proud**, "Evidence that the dephosphorylation of Ser535 in the ϵ -subunit of eukaryotic initiation factor (eIF) 2B is insufficient for the activation of eIF2B by insulin," *Biochemical Journal*, vol. 367, no. 2, pp. 475-481, 2002.
- [69] **D. Shahbazian *et al.***, "The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity," *The EMBO journal*, vol. 25, no. 12, pp. 2781-2791, 2006.
- [70] **P. P. Roux *et al.***, "RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 19, pp. 14056-14064, 2007.
- [71] **J.-P. David *et al.***, "Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development," *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 3, pp. 664-672, 2005.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [72] **N. Fujita, S. Sato, and T. Tsuruo**, "Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 49, pp. 49254-49260, 2003.
- [73] **J. A. Diehl, M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr**, "Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization," *Genes & development*, vol. 12, no. 22, pp. 3499-3511, 1998.
- [74] **C. F. Wu et al.**, "RSK promotes G2/M transition through activating phosphorylation of Cdc25A and Cdc25B," *Oncogene*, vol. 33, no. 18, pp. 2385-2394, 2014.
- [75] **J. C. Brüning et al.**, "Ribosomal subunit kinase-2 is required for growth factor-stimulated transcription of the c-Fos gene," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 6, pp. 2462-2467, 2000.
- [76] **R. Anjum, P. P. Roux, B. A. Ballif, S. P. Gygi, and J. Blenis**, "The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling," *Current Biology*, vol. 15, no. 19, pp. 1762-1767, 2005.
- [77] **M. Buck, V. Poli, T. Hunter, and M. Chojkier**, "C/EBP β phosphorylation by RSK creates a functional XEXD caspase inhibitory box critical for cell survival," *Molecular cell*, vol. 8, no. 4, pp. 807-816, 2001.
- [78] **J. Xing, D. D. Ginty, and M. E. Greenberg**, "Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase," *Science*, vol. 273, no. 5277, pp. 959-963, 1996.
- [79] **U. Doehn et al.**, "RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells," *Molecular cell*, vol. 35, no. 4, pp. 511-522, 2009.
- [80] **J. E. Gawecka et al.**, "RSK2 protein suppresses integrin activation and fibronectin matrix assembly and promotes cell migration," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 52, pp. 43424-43437, 2012.
- [81] **S. Tanimura et al.**, "SH3P2 is a negative regulator of cell motility whose function is inhibited by ribosomal S6 kinase-mediated phosphorylation," *Genes to Cells*, vol. 16, no. 5, pp. 514-526, 2011.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [82] **H. Ray-David et al.**, "RSK promotes G2 DNA damage checkpoint silencing and participates in melanoma chemoresistance," *Oncogene*, vol. 32, no. 38, pp. 4480-4489, 2013.
- [83] **Y. Romeo and P. P. Roux**, "Paving the way for targeting RSK in cancer," *Expert opinion on therapeutic targets*, vol. 15, no. 1, pp. 5-9, 2011.
- [84] **N. Abdulrahman et al.**, "Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase attenuates cell migration and proliferation of the human lung adenocarcinoma through phospho-GSK-3 β and osteopontin," *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 418, pp. 21-29, 2016.
- [85] **J. Cai et al.**, "Low expression of RSK4 predicts poor prognosis in patients with colorectal cancer," *International journal of clinical and experimental pathology*, vol. 7, no. 8, p. 4959, 2014.
- [86] **A. Thakur et al.**, "Anti-invasive and antimetastatic activities of ribosomal protein S6 kinase 4 in breast cancer cells," *Clinical cancer research*, vol. 14, no. 14, pp. 4427-4436, 2008.
- [87] **S. Kalin and F. Comert Onder**, "Discovery of potential RSK1 inhibitors for cancer therapy using virtual screening, molecular docking, molecular dynamics simulation, and MM/GBSA calculations," *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 43, no. 3, pp. 1424-1444, 2025.
- [88] **T. L. Nguyen**, "Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, vol. 8, no. 7, pp. 710-716, 2008.
- [89] **J. A. Smith, D. J. Maloney, S. M. Hecht, and D. A. Lannigan**, "Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor, SL0101," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 15, no. 14, pp. 5018-5034, 2007.
- [90] **G. P. Sapkota et al.**, "BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo," *Biochemical Journal*, vol. 401, no. 1, pp. 29-38, 2007.
- [91] **J. Bain et al.**, "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update," *Biochemical Journal*, vol. 408, no. 3, pp. 297-315, 2007.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [92] **K. A. Casalvieri, C. J. Matheson, D. S. Backos, and P. Reigan**, "Substituted pteridinones as p90 ribosomal S6 protein kinase (RSK) inhibitors: A structure-activity study," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 28, no. 5, p. 115303, 2020.
- [93] **I. Aronchik et al.**, "Novel potent and selective inhibitors of p90 ribosomal S6 kinase reveal the heterogeneity of RSK function in MAPK-driven cancers," *Molecular cancer research*, vol. 12, no. 5, pp. 803-812, 2014.
- [94] **R. Jain et al.**, "Discovery of potent and selective RSK inhibitors as biological probes," *Journal of medicinal chemistry*, vol. 58, no. 17, pp. 6766-6783, 2015.
- [95] **T. M. Kirrane et al.**, "Indole RSK inhibitors. Part 2: optimization of cell potency and kinase selectivity," *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 22, no. 1, pp. 738-742, 2012.
- [96] **S. J. Boyer et al.**, "Indole RSK inhibitors. Part 1: Discovery and initial SAR," *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 22, no. 1, pp. 733-737, 2012.
- [97] **R. M. Fryer et al.**, "Mitigation of off-target adrenergic binding and effects on cardiovascular function in the discovery of novel ribosomal S6 kinase 2 inhibitors," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 340, no. 3, pp. 492-500, 2012.
- [98] **D. Fomina-Yadlin et al.**, "Small-molecule inducers of insulin expression in pancreatic α -cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 34, pp. 15099-15104, 2010.
- [99] **M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, and J. Taunton**, "Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors," *Science*, vol. 308, no. 5726, pp. 1318-1321, 2005.
- [100] **M. S. Cohen, H. Hadjivassiliou, and J. Taunton**, "A clickable inhibitor reveals context-dependent autoactivation of p90 RSK," *Nature chemical biology*, vol. 3, no. 3, pp. 156-160, 2007.
- [101] **S. E. Dunn et al.**, "Abstract P3-10-10: PMD-026, a first-in-class oral p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor for triple negative breast cancer (TNBC)," *Cancer Research*, vol. 80, no. 4_Supplement, pp. P3-10-10-P3-10-10, 2020.
- [102] **A. Méant et al.**, "Proteomic analysis reveals a role for RSK in p120-catenin phosphorylation and melanoma cell-cell adhesion," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 19, no. 1, pp. 50-64, 2020.

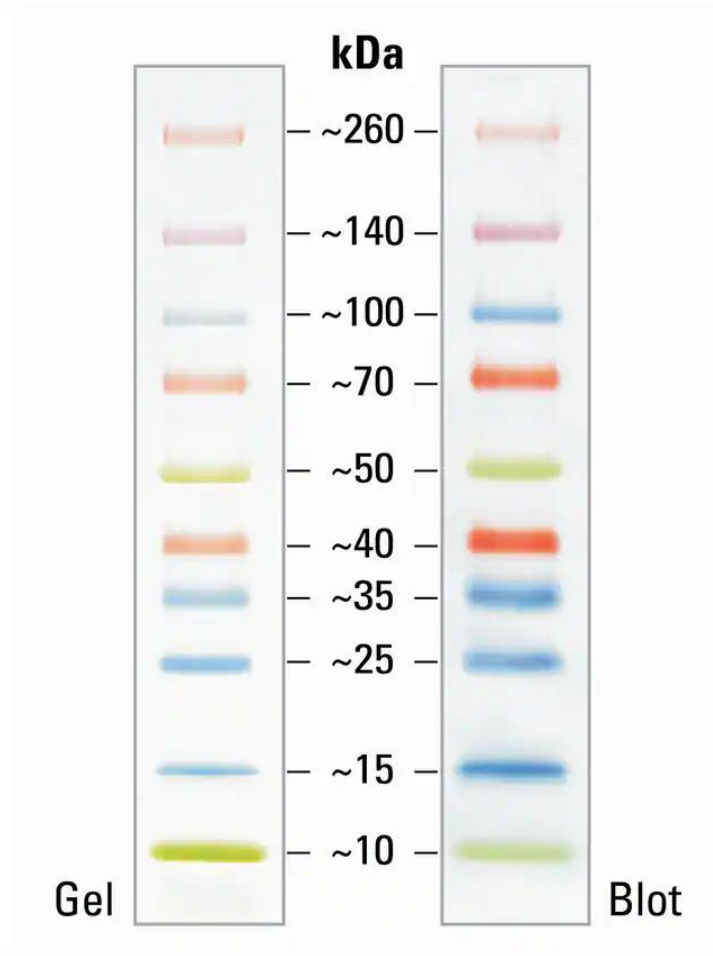
KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [103] **Y. Zhao, C. Björnbæk, S. Weremowicz, C. C. Morton, and D. E. Moller**, "RSK3 encodes a novel pp90 rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation," *Molecular and cellular biology*, vol. 15, no. 8, pp. 4353-4363, 1995.
- [104] **C. Peng et al.**, "Tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein 2 is a key mediator of the epidermal growth factor-induced ribosomal S6 kinase 2/cAMP-responsive element-binding protein/Fos protein signaling pathway," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 31, pp. 25881-25892, 2012.
- [105] **L. Lopez-Vicente et al.**, "Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is down-regulated in human tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 14, pp. 4546-4553, 2009.
- [106] **L. López-Vicente et al.**, "RSK4 inhibition results in bypass of stress-induced and oncogene-induced senescence," *Carcinogenesis*, vol. 32, no. 4, pp. 470-476, 2011.
- [107] **K. Yao et al.**, "RSK2 phosphorylates T-bet to attenuate colon cancer metastasis and growth," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 48, pp. 12791-12796, 2017.
- [108] **Q. Ye et al.**, "Effect of RSK4 on biological characteristics of colorectal cancer," *World journal of surgical oncology*, vol. 16, pp. 1-9, 2018.
- [109] **G. Jin et al.**, "Discovery of a novel dual-target inhibitor against RSK1 and MSK2 to suppress growth of human colon cancer," *Oncogene*, vol. 39, no. 43, pp. 6733-6746, 2020.

EKLER

EKLER

EK A: Tez Çalışmasında Kullanılan Büyüklük Belirteci



Thermo Scientific™ 26616 Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Marker

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ufuk MÜLHİM

Doğum tarihi ve yeri :

e-posta :

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2022-
Lisans	Yakın Doğu Üniversitesi/Eczacılık	2016-2021
Lise	TED Kayseri Koleji Özel Anadolu Lisesi	2012-2015